



Universidade de Aveiro

Departamento de Biologia

Ano 2013

**Sónia Maria Leite
Pereira**

**Efeito da temperatura e pH na inativação de
Listeria por alta pressão**

Declaração

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos académicos.



Universidade de Aveiro

Departamento de Biologia

Ano 2013

**Sónia Maria Leite
Pereira**

**Efeito da temperatura e pH na inativação de
Listeria por alta pressão**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e co-orientação do Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Viagem

Aparelhei o barco da ilusão
E reforcei a fé de marinheiro.
Era longe o meu sonho, e traiçoeiro
O mar...
(Só nos é concedida
Esta vida
Que temos;
E é nela que é preciso
Procurar
O velho paraíso
Que perdemos).
Prestes, larguei a vela
E disse adeus ao cais, à paz tolhida.
Desmedida,
A revolta imensidão
Transforma dia a dia a embarcação
Numa errante e alada sepultura...
Mas corto as ondas sem desanimar.
Em qualquer aventura,
O que importa é partir, não é chegar.

Miguel Torga, *Câmara ardente*

O júri

Presidente

Profª Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso

Professora auxiliar com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Arguente

Profª Doutora Carla Alexandra Pina Da Cruz Nunes

Professora auxiliar convidada da Secção Autónoma da Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro

Vogal

Profª Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha

Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Toda e qualquer palavra de gratidão parece vã quando comparada com os atos que a promoveram, contudo gostaria de deixar registada uma expressão gráfica de agradecimento:

Aos meus orientadores, a professora Ângela Cunha e o professor Jorge Saraiva por toda a simpatia, disponibilidade, apoio e incentivo manifestados ao longo deste projeto

À Marina Ferreira pelas horas de laboração compartilhadas

Ao Rui Queirós pela ajuda técnica com o equipamento de alta pressão

À professora Paula Teixeira que cedeu o microrganismo em estudo

À professora Sónia Mendo e Tânia Caetano por todo tempo e auxílio prestado

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Aplicada (LMAA) pela prestabilidade em esclarecer as mais diversas dúvidas que durante este tempo me assolaram

À professora Anabela Pereira de Oliveira por toda a atenção e paciência com a qual me brindou durante os meus primeiros passos no mundo da microbiologia ainda durante a licenciatura

A todos os professores que durante o meu percurso escolar me acompanharam e ajudaram a promover as minhas capacidades preparando-me para os desafios educacionais/profissionais futuros

A todos os grandes amigos que encontrei durante esta caminhada na Universidade de Aveiro e que sempre me apoiaram, proporcionaram bons momentos e encheram os meus dias de cor, música e expressões teatrais

Aos meus pais e irmão pelo tanto que me ensinam no dia a dia

Palavras-chave

Segurança alimentar estabilidade, qualidade, microbiologia, listeriose, inativação bacteriana, pressão, processamento, sinergia, temperatura, pH

Resumo

O estudo dos efeitos da pressão começou a despertar interesse na área das ciências biológicas a partir do final do século XIX. Desde então, o uso de alta pressão nas biociências tem sido alvo de crescente interesse e originado inovações notáveis em processos laboratoriais e industriais. O setor alimentar é atualmente um dos campos de maior potencial para a aplicação da tecnologia de alta pressão, pela possibilidade de inativar microrganismos e aumentar a segurança e estabilidade dos alimentos, sem alterar as suas propriedades organolépticas e nutricionais. A necessidade de adequar o protocolo de processamento às características dos organismos alvo tem levado à combinação da pressão com outros fatores físico-químicos que maximizam a eficiência de inativação.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da temperatura e do pH do meio na suscetibilidade de *Listeria*, à inativação por alta pressão, no sentido de criar conhecimento que permita a implementação de protocolos de processamento combinado. Para tal, culturas em fase estacionária foram submetidas a 300 MPa durante 5 minutos. Nos ensaios com variação de temperatura a pressurização foi conduzida a 4, 10 e 20 °C. Para o estudo do efeito do pH foram realizados ensaios em ambiente ácido (pH = 4), neutro (pH = 7) e alcalino (pH = 10). Para quantificação da inativação, fizeram-se diluições em série e procedeu-se à sementeira por incorporação das suspensões de células, antes e depois da pressurização, para determinação do teor de células viáveis (UFC mL⁻¹).

Pressurizações a baixas temperaturas (4 e 10 °C) revelaram ser mais eficientes do que quando efetuadas à temperatura ambiente (20 °C) e as células mostraram maior suscetibilidade à inativação, por alta pressão, em meio neutro e ácido do que em meio alcalino.

Os resultados permitem concluir que a eficiência de inativação depende não só do valor de pressão aplicado, mas também de outros parâmetros físico-químicos relacionados com o ambiente extracelular durante a pressurização, e evidenciam a necessidade da rigorosa adequação do protocolo de inativação às características físico químicas da matriz, no sentido de obter a maior eficiência de inativação dos microrganismos alvo.

Keywords

Food safety, microbiological quality, *Listeria*, high pressure temperature, pH

Abstract

The study of the biological effects of high pressure began to gain interest in the late nineteenth century. Since then, the use of high pressure in biosciences increased and originated notable innovations in laboratory and industrial processes. Currently, the food sector represents a field of great potential for the application of high pressure technology, due the possibility to inactivate microorganisms and increase food safety and stability while preserving organoleptic and nutritional properties. The need to adapt processing protocols to target microorganisms has led to the combination of pressure with other physical and chemical factors, in order to maximize inactivation efficiency.

The purpose of this study was the evaluation of the effects of temperature and pH of the medium on the susceptibility of *Listeria* to high pressure inactivation, in order to establish the scientific basis for the design of combined processing protocols. To this end, stationary phase cultures were subjected to 300 MPa, for 5 minutes. Pressurization was conducted at 4, 10 and 20 °C and the pH of the medium was manipulated to represent acid (pH 4), neutral (pH = 7) and alkaline (pH = 10) conditions. For determination of viable cells (CFU mL⁻¹), serial dilutions of the cell suspensions were made and pour-plated in solid medium before and after pressurization.

Low temperature pressurization (4, 10 °C) was more efficient than the process conducted at room temperature (20 °C) and cell susceptibility to high pressure was enhanced in neutral and acidic environment, comparatively with alkaline medium.

The results confirm that the efficiency of the high pressure inactivation of *Listeria* depends not only the pressure applied, but also on other physical and chemical parameters related to the extracellular environment during pressurization, such as temperature and pH. As a consequence, a careful design of the processing protocol may significantly improve the efficiency of inactivation of target microorganisms.

Lista de tabelas	IX
Lista de figuras	XI
Lista de abreviaturas.....	XIII

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

1. Microbiologia e segurança alimentar.....	1
2. Processamento de alimentos por alta pressão hidrostática.....	2
2.1. Equipamentos de pressurização	3
2.2. Princípios regentes na pressurização	5
2.3 Vantagens e limitações da tecnologia de alta pressão	5
3. Inativação de microrganismos por alta pressão	8
3.1. Alvos celulares e moleculares da alta pressão	9
3.2. Alterações morfo-fisiológicas em microrganismos causadas pela alta pressão.....	11
4. Processamento combinado envolvendo alta pressão	12
4.1. Alta pressão e temperatura.....	13
4.2. Alta Pressão e pH.....	14
4.3. Alta pressão e atmosfera de CO ₂	15
4.4. Alta pressão e agentes antimicrobianos	15
5. Listeriose como toxico-infecção alimentar	16
6. O género <i>Listeria</i>	18
6.1. Taxonomia	18
6.2. Características morfológicas e estruturais	19
6.3. Características culturais	20
6.4. Características bioquímicas	20
6.5. Nutrição	21
6.6. Crescimento	21

6.7. Dispersão	22
6.8. <i>Listeria innocua</i> como modelo biológico de <i>Listeria monocytogenes</i>	23
7. Objetivos.....	24

CAPÍTULO II: MATERIAIS E MÉTODOS

1. Material biológico	25
3. Processamento por alta pressão	26
3.1. Equipamento de alta pressão.....	26
3.2. Preparação de culturas em fase estacionária.....	27
3.3. Ensaio de pressurização	27
3.3.1. Cinética de inativação de <i>Listeria innocua</i> em função da pressão.....	28
3.3.2. Efeito da temperatura	28
3.3.3. Efeito do pH	29
3.4. Determinação da concentração de células viáveis	29
3.5. Tratamento estatístico	29

CAPÍTULO III: RESULTADOS

1. Perfil de crescimento de <i>Listeria innocua</i> em meio líquido.....	31
2. Cinética de inativação de <i>Listeria innocua</i> em função da pressão.....	32
3. Efeito da temperatura	33
4. Efeito do pH	33

CAPÍTULO IV: DISCUSSÃO

1. Cinética de inativação de <i>Listeria innocua</i> em função da pressão	35
2. Efeitos da temperatura.....	37
3. Efeito do pH	38
Conclusões	41
Perspetivas futuras	41
Anexos.....	61

Lista de tabelas

Tabela 1. Unidades utilizadas na quantificação de pressão	3
Tabela 2. Taxonomia de <i>Listeria</i>	18

Lista de figuras

Fig. 1. Métodos de preservação alimentar ao longo da História.	1
Fig. 2. Distribuição do processamento por Altas Pressões Hidrostáticas por diferentes setores alimentares..	2
Fig. 3. Variáveis do processamento por Alta Pressão.	4
Fig. 4. Representação esquemática de um vaso de pressurização.	4
Fig. 5. Análise SWOT da técnica de alta pressão associada à indústria alimentar.	7
Fig. 6. Efeito de HPP em células de <i>Salmonella typhimurium</i> em células em fase estacionária em fosfato de sódio (pH 7).	12
Fig. 7. Diagrama da água.	13
Fig. 8. Presunto cozido inoculado com <i>Listeria monocytogenes</i>	19
Fig. 9. Colónias de <i>Listeria innocua</i> em substrato de agar.	20
Fig. 10. Crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> a temperaturas de refrigeração ou congelação Holf, 1996.	22
Fig. 11. Modelo de evolução de LIPI-1 entre as espécies de <i>Listeria</i>	23
Fig. 12. Cinética de crescimento de <i>Listeria innocua</i> com base em densidade ótica e UFC	31
Fig. 13. Inativação de <i>Listeria innocua</i> por HPP (5 min, $T \cong$ ambiente) a diferentes pressões	32
Fig. 14. Inativação de <i>Listeria innocua</i> por HPP (300 MPa, 5 min) a diferentes temperaturas	33
Fig. 15. Inativação de <i>Listeria innocua</i> por HPP (300 Mpa, 5 min, $T \cong$ ambiente) a diferentes níveis de pH.	34

Lista de abreviaturas

A	Área
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CECT	<i>Colección Española de Cultivos Tipo</i>
CIP	<i>Collection of Institut Pasteur</i>
CAMP	Christie–Atkins–Munch–Petersen
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
HHP	<i>High Hydrostatic Pressure</i>
HPP	<i>High Pressure Process</i>
L.	<i>Listeria</i>
LIPI-1	<i>Listeria pathogenicity island 1</i>
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
rpm	Rotações por minuto
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidade formadora de colónia
UK	<i>United Kingdom</i>
UV	Ultravioleta

1. Microbiologia e segurança alimentar

Em 1658, Athanasius Kircher, monge jesuíta alemão, estabeleceu pela primeira vez uma relação entre microrganismos, produtos alimentares e a deterioração destes últimos (Jay *et al.*, 2005). Termos como doença e patogenicidade só decorridos muitos anos seriam anexados a esta conjectura (Kass e Riemann, 2006). Atualmente, tais conceitos são indissociáveis sendo conhecido que o alimento é utilizado, como veículo de transmissão, por várias espécies bacterianas com carácter patogénico.

A segurança alimentar existe, segundo a definição da FAO, “quando as pessoas têm, a todo momento, acesso físico e económico a alimentos seguros, nutritivos e suficientes para satisfazer as suas necessidades dietéticas e preferências alimentares, a fim de levarem uma vida ativa e saudável” (FAO, 1996). O controlo de qualidade e segurança dos alimentos deve estender-se a todas as etapas da cadeia de produção: produção primária (agricultura, pecuária), processamento industrial, transporte, manutenção, armazenamento e manuseamento por parte do consumidor (Schleining, 2007).

Ao longo da História da Humanidade, o aparecimento e domínio de novas técnicas e tecnologias tem provocado alterações no padrão de métodos de tratamento e preservação alimentar utilizados (Figura 1). Os procedimentos térmicos em geral e

a pasteurização em particular são, hoje em dia, os métodos

predominantemente utilizados. Tal, deve-se a uma eficaz inativação de microrganismos, grande disponibilidade e baixo custo. Todavia, estes tratamentos podem conduzir a alterações pouco favoráveis, nomeadamente, desnaturação proteica, alterações texturais e perda de vitaminas e sabores (Lado e Yousef, 2002).

A crescente exigência e preferência dos consumidores, por produtos minimamente processados e com características organoléticas e sensoriais intactas, conduziu à pesquisa e introdução de técnicas físicas que permitissem contornar os efeitos indesejáveis associados



Fig. 1. Métodos de preservação alimentar ao longo da História. Heinz e Buckow, 2010

ao tratamento pela temperatura. Radiação, alta pressão, impulsos elétricos, ultrasons e campos magnéticos oscilatórios constituem alguns exemplos de métodos emergentes (Chapleau *et al.*, 2006; Heinz e Buckow, 2010).

Entre estes novos métodos, a utilização de altas pressões, processo comumente designado por *High Hydrostatic Pressure* (HHP) ou *High Pressure Process* (HPP), tem vindo a ganhar relevância em diferentes setores alimentares. Esta é uma técnica promissora aplicada já industrialmente a diversos produtos disponíveis no mercado: sumos de frutas,

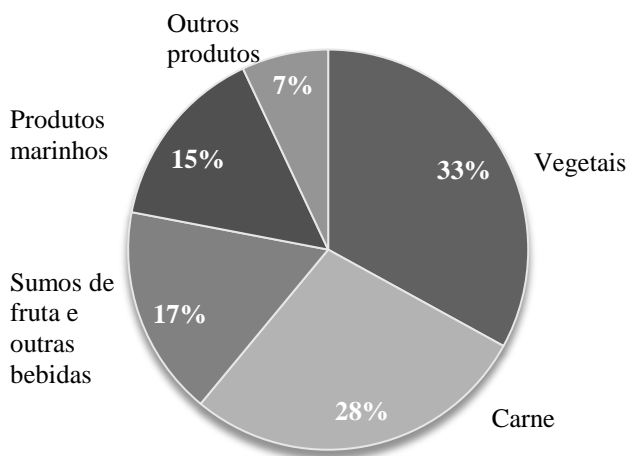


Fig. 2. Distribuição do processamento por Altas Pressões Hidrostáticas por diferentes setores alimentares. Heinz e Buckow, 2010.

compotas, presunto, *guacamole*, temperos, arroz, peixe e marisco (Murchie *et al.*, 2005). Vegetais e carne são os alimentos nos quais esta técnica é mais aplicada (Figura 2). A comercialização de produtos tratados por HPP iniciou-se no Japão em 1990, expandindo-se para a Europa e Estados Unidos da América a partir de 1996 (Heinz e Buckow, 2010).

2. Processamento de alimentos por alta pressão hidrostática

A pressão (P) é uma variável, definida primariamente por Pascal, como a intensidade de uma força (F) perpendicular à superfície de aplicação, por unidade de área (A), sendo expressa matematicamente como:

$$P = F/A$$

A pressão exercida por um fluido confinado é dada pelo rearranjo da equação anterior, sendo equivalente à sua massa (m) multiplicada pela força da gravidade (g), tendo este valor, que ser expresso por unidade de área. A massa do líquido é obtida através do produto entre o volume e a densidade específica (ρ) do fluido em questão, o que origina

assim a expressão vulgarmente utilizada para a determinação da pressão hidrostática (Atkins, 2001):

$$P = \rho gh$$

A pressão é uma grandeza escalar expressa no Sistema Internacional pelo Pascal (Pa), que corresponde ao Newton por metro quadrado (N m^{-2}) (Levine, 1995; Atkins e Jones, 2005). Não obstante, outras unidades são frequentemente usadas (Tabela 1).

As pressões utilizadas para o processamento de alimentos variam entre 100 e 1000 MPa. Esta gama corresponde a valores muito elevados, em comparação com a gama de valores representada na biosfera (Raso e Barbosa-Cánovas, 2003), que varia entre 0,03 MPa no Everest, o ponto mais elevado do planeta, e 110 MPa na Fossa das Marianas no Pacífico (Considine *et al.*, 2008; Aertsen *et al.*, 2009). Assim, o limite máximo hiperbárico que se observa na Natureza constitui o valor mínimo de pressão aplicado na indústria alimentar.

Tabela 1. Unidades utilizadas na quantificação de pressão^a

Unidades	Símbolo	Valor
Pascal	Pa	N m^{-2} $\text{Kg m}^{-1}\text{s}^{-2}$
Bar	Bar	10^5 Pa
Atmosfera	Atm	$1,01325 \times 10^5$ Pa
Torriceli	Torr	133.32 Pa
Milímetros de mercúrio	mmHg	133.32 Pa
<i>Pounds per square inch</i>	Psi	6849,757 Pa

^a Adaptado de Atkins, 2001 e Atkins e Paula, 2006

2.1. Equipamentos de pressurização

A aplicação de altas pressões a alimentos é feita em equipamentos, cuja constituição fundamental inclui um vaso de pressurização (Figura 3). Este possui uma câmara para colocação das amostras, um fluido de transmissão e uma ou mais bombas geradoras de pressão (Patterson, 2005). O processamento inicia-se com a abertura do tampo e colocação da amostra/alimento empacotada(o) na câmara de pressurização. Após selado o vaso, o fluido de transmissão é forçado a entrar na câmara por bombeamento, o que cria uma pressão isostática. Esta é a designada fase de carregamento. O fluido utilizado é normalmente constituído por água, óleos ou uma mistura de ambos. A função dos óleos é

proteger o vaso de pressurização da corrosão (Balasubramaniam e Balasubramaniam, 2003). O aumento da pressão pode ainda ser coadjuvado por êmbolos por forma a criar uma redução de volume na câmara do vaso (Hogan *et al.*, 2005).

O funcionamento das bombas mantém-se ativo até ser atingida a pressão desejada (fase de compressão). Esta força é rapidamente transmitida entre fluido e amostra. Seguidamente, as válvulas são fechadas e a pressão mantida durante o tempo pré-determinado pelo utilizador (*holding time*), não sendo necessário nesta fase consumo energético adicional (Patterson, 2005; Knorr *et al.*, 2011).

Durante este processo verifica-se uma ligeira variação de temperatura (Figura 4). No caso da água, na fase de

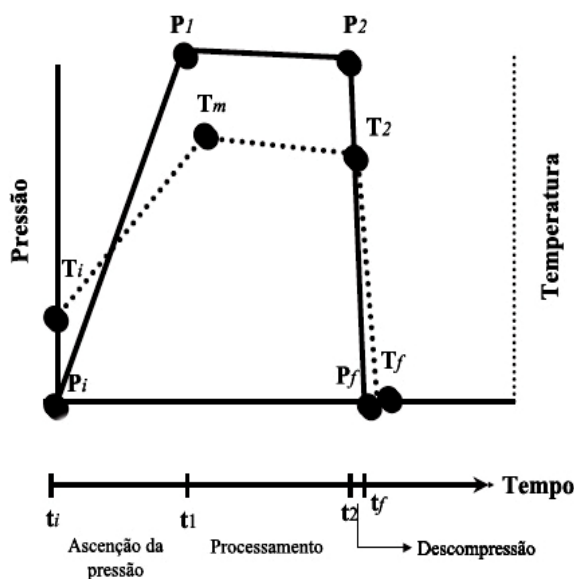


Fig. 3. Variáveis do processamento por Alta Pressão. P_i - Pressão inicial; P_f - pressão final; T_i -temperatura inicial; T_m - temperatura máxima; t_i -tempo inicial e t_f -tempo final. Balasubramaniam *et al.*, 2004.

2004). Após o tempo de processamento, inicia-se a despressurização do sistema. O processo termina com a abertura do equipamento (Bevilacqua, 2010).

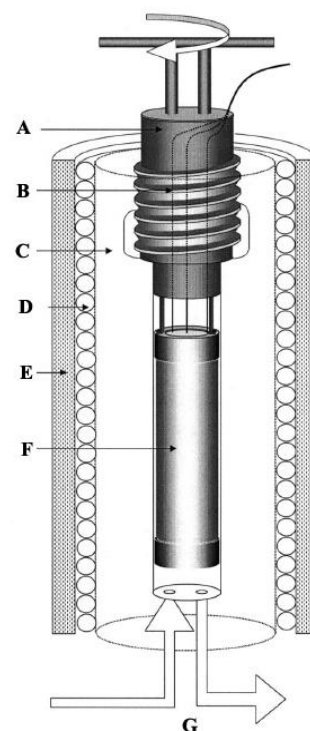


Fig. 4. Representação esquemática de um vaso de pressurização. **A-** Tampa; **B-** Par termoeletrico; **C-** Vaso de Alta Pressão; **D-** Tubos de aquecimento / refrigeração; **E-** Isolamento; **F-** Câmara de pressurização; **G-** Entrada/saída do fluido de transmissão. Denys *et al.*, 2000

compressão, existe um aumento de cerca de 2-3 °C por 100 MPa. Este aumento é influenciado pela temperatura inicial do material, sua compressibilidade e calor específico (Rastogi *et al.*, 2007).

Verifica-se que quanto maior a temperatura inicial, maior é o aumento de temperatura nesta fase (Balasubramaniam *et al.*,

O modo de pressurização descrito é designado por *batch*. Os alimentos líquidos podem, todavia, ser tratados de modo semi-contínuo. Neste segundo caso, existem vários vasos de pressurização. Estes são providos de pistões móveis onde se move o fluido de transmissão, que são responsáveis pela compressão. Recorrendo a bombas de baixa pressão os alimentos são carregados diretamente para o vaso. A vantagem adicional deste sistema é a possibilidade de cada vaso se poder encontrar numa fase diferente do tratamento, podendo ser mantida uma laboração contínua (Nguyen e Balasubramaniam, 2011).

2.2. Princípios regentes na pressurização

Um dos princípios subjacentes ao processamento de alimentos por alta pressão é o princípio de Le Châtelier. Tal, estabelece que um sistema em equilíbrio responde a qualquer perturbação que lhe é imposta com alterações que tendem contrariar a perturbação a que foi sujeito. Assim, sob pressão, o sistema vai tender para um estado de menor volume, bem como acelerar as reações que a esse estado conduzem (Oger e Jebbar, 2010). Outro efeito que alicerça o tratamento por HPP é o princípio isostático ou princípio de Pascal. Este postula que a pressão exercida por um fluido confinado apresenta um carácter uniforme, sendo aplicada ao mesmo tempo e com a mesma intensidade em todas as direções do espaço. Deste modo, permite que o tratamento aplicado seja independente do volume, dimensões e geometria das amostras e não se formem gradientes durante o tratamento, tal como acontece com a pasteurização, tratamentos por micro-ondas ou por radiação (Smelt, 1998; Rastogi *et al.*, 2007).

2.3 Vantagens e limitações da tecnologia de alta pressão

A expansão da técnica de pressurização no mercado alimentar, em detrimento da pasteurização, encontra-se apoiada no desenvolvimento de numerosos estudos que têm contribuído sistematicamente para o esclarecimento de vantagens e desvantagens associadas a este processamento e seus efeitos nos produtos alimentares, tal como resumido na análise SWOT representada na figura 5.

As maiores vantagens desta tecnologia relacionam-se com a possibilidade de ultrapassar fatores limitantes do processamento térmico. O processamento por alta pressão evita a formação de gradientes de tratamento nos produtos, é independente da forma, volume e geometria dos mesmos e processa-se de forma homogênea e quase instantânea (Knorr, 1995; Torres e Velasquez, 2005; Heinz e Buchow, 2010).

Outra categoria de vantagens relaciona-se com as características sensoriais dos alimentos, sendo as texturas preservadas ou mesmo melhoradas, (Torres e Velasquez, 2005) enquanto são inativadas reações químicas envolvidas na formação de sabores desagradáveis e evitada a destruição de nutrientes e pigmentos (Mújica-Paz *et al.*, 2011). Relativamente aos tratamentos térmicos, o processamento por alta pressão reduz o consumo energético e a “pegada ecológica”, uma vez que, elevar a pressão a 500 MPa requer um gasto de energia muito menor do que o necessário para fazer subir a temperatura até 100 °C (Pereira e Vicente, 2010; Toepfl *et al.*, 2006).

A tecnologia de alta pressão apresenta ainda um elevado potencial de otimização para novas aplicações como a possibilidade de aplicar a técnica em fase de congelamento ou descongelamento dos produtos e/ou combinação entre pressão e outros fatores de preservação de alimentos e pode ser aplicada com os produtos já embalados, desde que as embalagens sejam flexíveis, evitando re-contaminações (Lambert *et al.*, 2000).

Os principais inconvenientes apontados a este processamento residem em obstáculos metodológicos de aplicação prática, os quais comprometem a comparação entre estudos efetuados por diferentes unidades de investigação, tais como: as diferentes configurações e *designs* dos equipamentos de alta pressão aliados a uma descrição insuficiente dos parâmetros que influenciam o processo, variações na preparação do inóculo, no tratamento das amostras e na contagem de microrganismos (Balasubramaniam *et al.*, 2004). Variáveis como o nível de pressão, tempo de tratamento, taxa de compressão/descompressão, temperatura e sua variação ao longo do processo requerem especial atenção por parte do investigador (Alpas *et al.*, 2000). Este cuidado deve também ser mantido para com as amostras, tendo em atenção factores intrínsecos que podem condicionar e variar o rendimento do processo de inativação como: a matriz alimentar e sua constituição, atividade de água, pH das amostras, diversidade de perfis de resistência à pressão (tanto entre espécies quanto entre estirpes) e fase de crescimento da cultura bacteriana a testar (Alpas *et al.*, 1999; Rendueles *et al.*, 2011).

Tecnologia de Alta Pressão

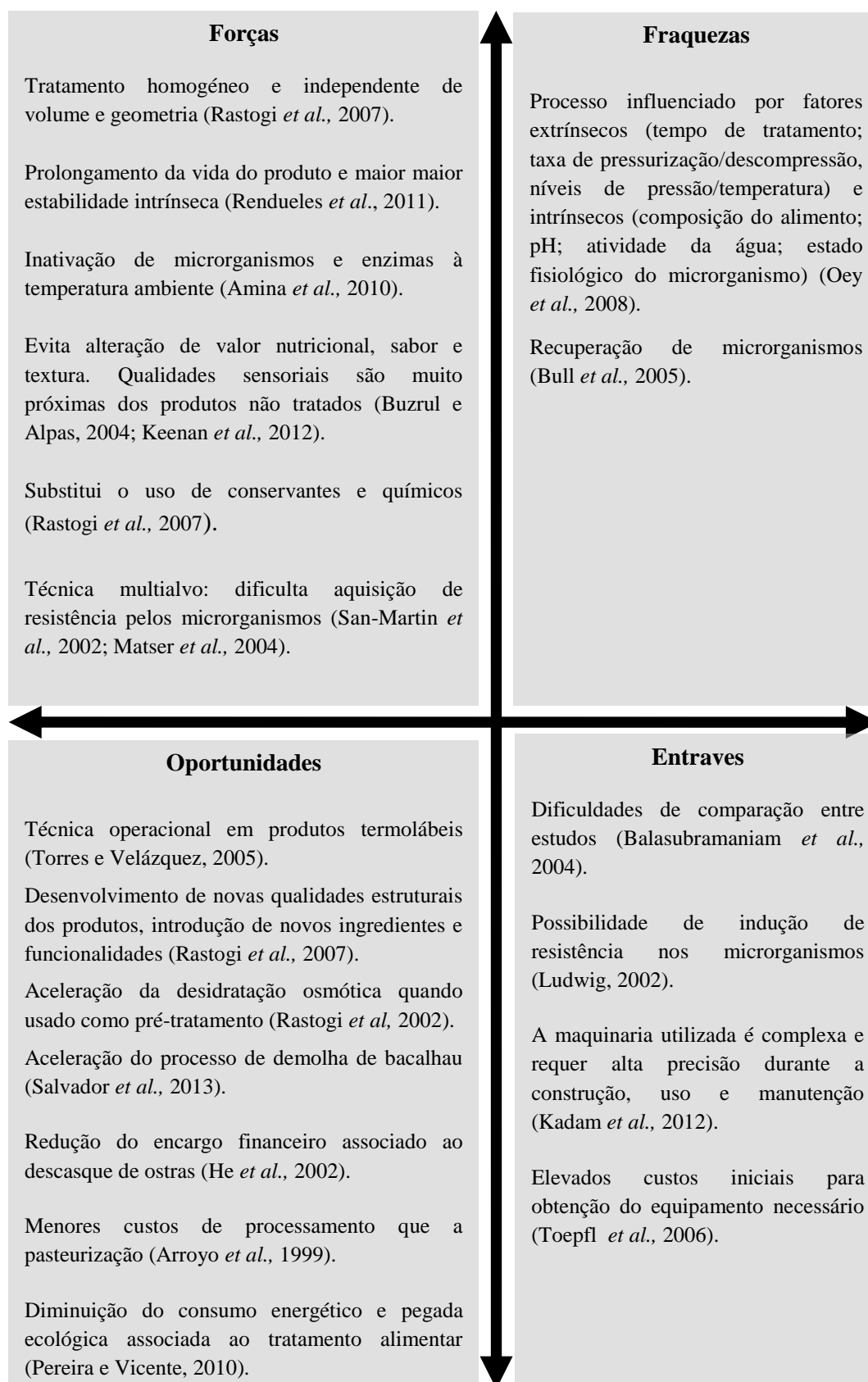


Fig. 5. Análise SWOT da técnica de alta pressão associada à indústria alimentar.

3. Inativação de microrganismos por alta pressão

O interesse pela tecnologia de alta pressão iniciou-se durante o século XIX, estando diretamente relacionado com o desenvolvimento de equipamentos geradores de pressão. A sua introdução no domínio das biociências ocorreu, no virar desse século, através do estudo dos efeitos da pressão em organismos de fundos oceânicos (Demazeau e Rivalain, 2011a).

As primeiras observações de inativação de microrganismos, por alta pressão hidrostática, são descritas por Roger entre 1892 e 1895 (Demazeau, 2009; Demazeau e Rivalain, 2011b). A aplicação deste efeito na área da preservação alimentar deu-se quatro anos mais tarde, em 1899, por Hite que foi considerado, por este feito, o precursor do tratamento alimentar por alta pressão (Hite, 1899; Demazeau e Rivalain, 2011b). A produção de alimentos seguros requer um adequado conhecimento das respostas fisiológicas dos microrganismos perante os agentes promotores de inativação (Mañas e Pagán, 2005). Neste contexto, alguns patogénicos alimentares, nomeadamente, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Vibrio* spp são bactérias extensivamente estudadas, em termos de inativação por HPP (Considine *et al.*, 2008).

A inativação de microrganismos através de HPP decorre de uma ação multi-alvo. Deste modo, a destruição das células está associada, não tanto a lesões irreversíveis numa estrutura ou função particular, mas a acumulação de danos generalizados dos quais a célula não consegue recuperar (Rendueles *et al.*, 2011). Pressões compreendidas entre os 300 e os 600 MPa conseguem inativar leveduras, fungos, vírus e a maioria das espécies bacterianas patogénicas, cujo veículo de transmissão é o alimento (Smelt, 1998). A resistência intrínseca dos microrganismos à alta pressão é variável sendo possível estabelecer, na generalidade, o seguinte gradiente de resistência: protozoários e parasitas < leveduras e fungos filamentosos < bactérias de Gram negativo < bactérias de Gram positivo < endósporos (Arroyo *et al.*, 1999; Rendueles *et al.*, 2011).

De um modo geral, observa-se que quanto mais complexos os organismos, maior a sua sensibilidade à inativação por alta pressão (Yuste *et al.*, 2001). Assim, as células eucarióticas são mais sensíveis do que as procarióticas. Embora as células vegetativas dos fungos sejam bastante susceptíveis, os ascósporos, de espécies resistentes ao calor, como

as pertencentes aos géneros *Byssochlamys*, *Neosartorya* e *Talaromyces*, resistem a pressões de 800 MPa requerendo, por isso, um tratamento combinado entre pressão e outros fatores, tal como acontece com os endosporos bacterianos (Black *et al.*, 2007a; Considine *et al.*, 2008).

Nas bactérias, a barotolerância difere bastante entre espécies de Gram positivo e de Gram negativo, sendo as últimas geralmente mais sensíveis à pressão. Este padrão está relacionado com presença de ácidos teicóicos na camada de peptidoglicano das bactérias de Gram positivo (Escriu e Mor-Mur, 2009) e com o facto de as bactérias de Gram negativo possuírem uma parede celular mais fina e uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos, o que a torna mais suscetível à pressão (Pilavtepe-Çelik *et al.*, 2008). Os endósporos bacterianos apresentam um revestimento formado por várias camadas que, no seu conjunto, conferem elevada resistência intrínseca, podendo resistir a 1000 MPa. Para a inativação de endósporos pode ser necessária a indução prévia da germinação ou a combinação de HPP com outras técnicas (Mor-Mur e Yuste, 2005).

A morfologia das células tem também influência na sua sensibilidade à pressão. Os cocos são mais sensíveis à pressão, sucedendo-lhes as formas pleomórficas e os bastonetes direitos ou encurvados (San Martín *et al.*, 2002).

A suscetibilidade dos vírus à pressão varia dentro de uma gama bastante alargada em virtude da grande diversidade estrutural. Verifica-se, no entanto, que os vírus com envelope têm uma maior sensibilidade à pressão relativamente a vírus que não possuem esta estrutura (Kovac *et al.*, 2010).

3.1. Alvos celulares e moleculares da alta pressão

A membrana citoplasmática constitui um dos principais alvos da pressão. As moléculas lipídicas que a constituem são fortemente afetadas por este parâmetro (Rivalain *et al.*, 2010). Durante a fase de compressão, ocorre uma redução da espessura da membrana citoplasmática, o que resulta de várias alterações estruturais (San Martín *et al.*, 2002). A maior ordenação das cadeias de ácidos gordos reflete-se na substituição de uma fase líquida-cristalina dos fosfolípidos por uma fase de gel. Sob pressão, é induzida a formação de várias fases de gel, o que não se verifica a condições atmosféricas (Daniel *et*

al., 2006). A cristalização dos fosfolípidos conduz a perda de fluidez membranar, necessária à regulação do gradiente iónico. A associação entre membrana e proteínas, nesta contidas, é também afectada. Verifica-se, ainda, redução da atividade de complexos proteicos, como por exemplo, as ATPases. Tal, interfere no fluxo de prótons e consequentemente na regulação do pH, condicionando a homeostase intracelular (Murchie *et al.*, 2005). Estes efeitos agravam-se ainda mais durante a fase de descompressão, ocorrendo formação de poros, disrupção membranar e libertação do material citoplasmático (Rendueles *et al.*, 2011).

A maioria das reações envolvidas em vias bioquímicas encontram-se associadas a modificações de volume. Sob pressão, verifica-se um efeito adjuvante para com as que promovem redução de volume, e em contraponto, um efeito antagónico quando se manifesta um aumento (Patterson, 2005). A pressão atua sobre os ácidos nucleicos causando a sua condensação. Estas alterações têm efeito significativo no funcionamento do genoma, nomeadamente, nos processos de replicação e transcrição. A síntese proteica é fortemente reprimida devido à dissociação das subunidades ribossomais, fator que restringe a capacidade de adaptação de microrganismos a altas pressões (Abe, 2007).

As respostas adaptativas de microrganismos que sobrevivem a uma exposição subletal à pressão incluem a ativação do mecanismo de resposta SOS. Embora tipicamente associado a danos no DNA, este mecanismo está também envolvido na rápida adaptação das bactérias a fatores de stresse (Aertsen *et al.*, 2004; Aertsen e Michiels, 2005). A pressão induz a expressão de genes de proteínas de choque térmico o que leva a propor que, ao nível membranar e de síntese proteica, os efeitos da alta pressão são análogos aos das temperaturas extremas (Bartlett, 2002).

De forma geral, os tratamentos por pressão envolvem menor energia que os tratamentos térmicos. Enquanto que para elevar a temperatura de um litro de água de 20 para 25 °C são necessários 20,9 kJ, para uma pressurização a 400 MPa apenas são precisos 19,2 kJ, por litro de água. Assim, o tratamento por alta pressão afeta preferencialmente ligações fracas sem, contudo, interferir com ligações covalentes (Rastogi *et al.*, 2007). Estas últimas, começam apenas a ser afectadas a pressões de cerca de 2 Gpa (Oger e Jebbar, 2010), o que torna a desnaturação pela pressão diferente da que se processa pelo calor (Rivalain *et al.*, 2010). Moléculas ricas em ligações químicas fracas (pontes de hidrogénio, ligações iónicas e interações hidrofóbicas) constituem importantes alvos dos efeitos da

pressão, com consequente perda das suas funções (Balny, 2004). As proteínas são alvo de alterações nas estruturas secundária, terciária e quaternária, todavia a estrutura primária, mantida por ligações covalentes, é preservada (Considine *et al.*, 2008). Dependendo da magnitude dos parâmetros utilizados, a desnaturação proteica pode ser reversível. As alterações irreversíveis ocorrem apenas quando o nível dos 300 MPa é ultrapassado, pois as proteínas oligoméricas tornam-se vulneráveis à dissociação (Rastogi *et al.*, 2007). A incorporação de moléculas de água na arquitetura proteica, durante a pressurização, pode também estar associada a alterações conformacionais (Rivalain *et al.*, 2010). As alterações conformacionais das proteínas podem constituir uma mais-valia na indústria, aumentando a digestibilidade e reduzindo a alergenicidade destas moléculas (Zeece *et al.*, 2008; Paschke, 2009). A estabilização e inativação de enzimas, como oxidases, constitui um dos pontos a favor do uso desta tecnologia. Este efeito impede o desenvolvimento de sabores desfavoráveis nos alimentos, aumentando consequentemente a sua qualidade (Rastogi *et al.*, 2007) e é, por outro lado, um ponto fulcral na inativação microrganismos (Murchie *et al.*, 2005).

Constituintes químicos associados a boas qualidades alimentares como: sabor, cor ou valor nutricional, apresentam reduzidos níveis de dano. As moléculas mais pequenas como: aminoácidos, vitaminas e compostos que originam o sabor, têm propriedades barotolerantes e permanecem inalteradas (Heinz e Buckow, 2010).

3.2. Alterações morfo-fisiológicas em microrganismos causadas pela alta pressão

A exposição de microrganismos a níveis elevados de pressão induz alterações na morfologia e fisiologia das células, sendo que a severidade aumenta com o aumento dos valores de pressão (Tholozan *et al.*, 2000).

Após exposição a alta pressão, é possível, por observação em microscopia eletrónica (Figura 6), detetar a ocorrência de cicatrizes, irregularidades e enrugamentos na superfície das células, que se fazem acompanhar, frequentemente, de disrupção membranar (Ritz *et al.*, 2002). Pode ocorrer ainda contração da parede, formação de poros e descolamento entre parede e membrana (Arroyo *et al.*, 1999). *Mycoplasma pneumoniae* apresenta uma barotolerância muito superior à de bactérias de Gram positivo, o que tem

levado a propor que a parede é um alvo relevante dos efeitos da alta pressão e que danos nesta estrutura estão fortemente relacionados com a inativação de microrganismos (Hartmann *et al.*, 2006). Os danos na parede celular dos microrganismos, em pressões subletais, não são uniformes em toda a população, existindo assim, possibilidade de recuperação por parte de sub-populações mais resistentes (Ritz *et al.*, 2006).

Em termos fisiológicos, verifica-se uma diminuição progressiva dos níveis de adenosina trifosfato (ATP) intracelulares, resultado da ineficiência das ATP sintetases (Tholozan *et al.*, 2000), podendo causar a perda de mobilidade descrita para algumas bactérias (Nishiyama e Sowa, 2012). O metabolismo é também afectado pela alteração da atividade de enzimas intracelulares (Ritz *et al.*, 2001). Após exposição a alta pressão, pode ocorrer condensação do citossol, do nucleóide e dos ribossomas (Kaletunç *et al.*, 2004) e ainda perda de culturabilidade, associada à interferência na formação de anéis septais, processo crucial da divisão celular (Bowman *et al.*, 2008).

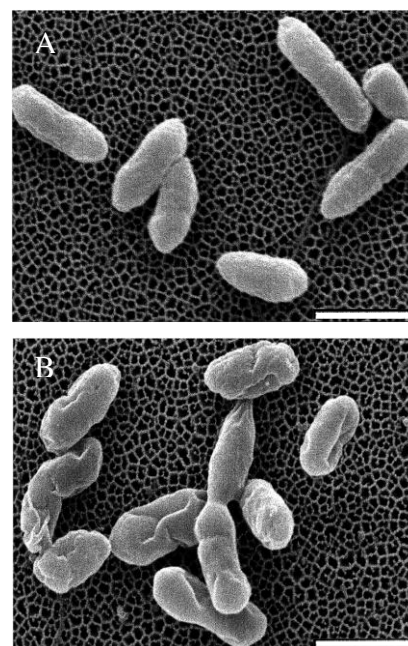


Fig. 6. Efeito de HPP em células de *Salmonella typhimurium* ATCC 13 311 em células em fase estacionária em fosfato de sódio (pH 7). A- células não submetidas a pressão e B- células tratadas com 400 Mpa, 10 min, 20 °C (B) (SEM). Tholozan *et al.*, 2000.

4. Processamento combinado envolvendo alta pressão

O conceito de barreiras ou *hurdle concept*, na terminologia original, desenvolvido pelo investigador Lothar Leistner, traduz uma combinação de vários fatores de preservação por forma a garantir a segurança microbiológica e estabilidade dos produtos alimentares (Leistner, 2000). Esta abordagem assenta na combinação de efeitos de várias técnicas de preservação, por forma a criar, por exposição a vários agentes de stresse, um ambiente hostil ao desenvolvimento de microrganismos. Desta forma, é possível reduzir a intensidade de exposição do alimento a um determinado fator, podendo refletir-se na

diminuição dos custos de processamento e no aumento da segurança do produto (Leistner e Gorris, 1995).

4.1. Alta pressão e temperatura

A combinação entre pressão e temperatura tem sido muito explorada, na perspectiva da inativação de microrganismos em alimentos. As células vegetativas de bactérias apresentam maior resistência à alta pressão quando o tratamento é feito a temperaturas moderadas (entre 20 e 30 °C), sendo mais sensíveis a temperaturas inferiores ou superiores a esta gama (Alpas *et al.*, 2000; Raso e Barbosa-Cánovas, 2003; Picart *et al.*, 2005). Os endósporos são menos suscetíveis à inativação. A conjugação entre alta pressão e alta temperatura aumenta, significativamente, a eficiência de inativação de endósporos e garante uma segurança alimentar acrescida, relativamente à aplicação de tratamento térmico simples (Lee *et al.*, 2002; Krebbers *et al.*, 2003; Cléry-Barraud *et al.*, 2004).

Por sua vez, a recente aplicação de pressão em temperaturas inferiores a 0 °C tem demonstrado boas perspectivas de redução de microrganismos (Luscher *et al.*, 2004; Picart *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2005).

Em alguns casos, verifica-se mesmo uma qualidade sensorial superior à resultante por HPP à temperatura ambiente (Fernández *et al.*, 2007). A temperaturas negativas, a pressão a aplicar pode ser controlada por forma tirar partido das propriedades da água (Figura 7). A combinação entre estes dois parâmetros permite trabalhar sob seis formas sólidas de água com propriedades físicas distintas (Cheftel *et al.*, 2000). A exploração das

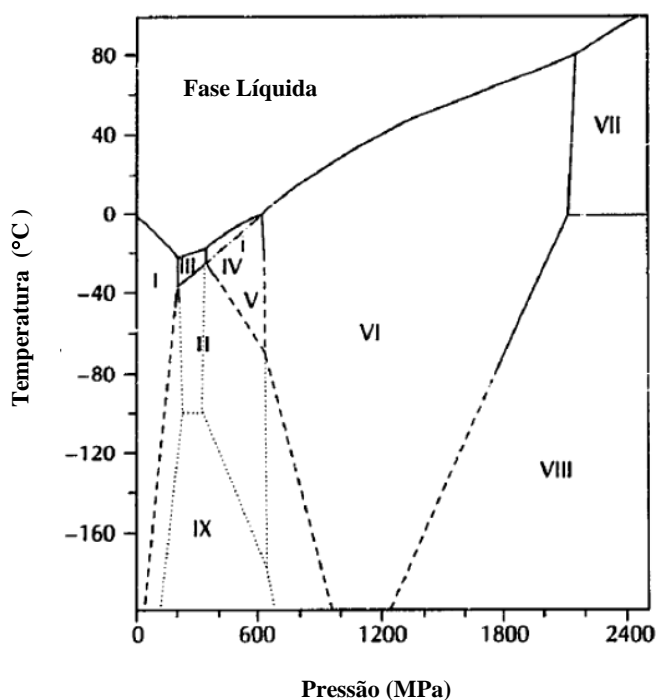


Fig. 7. Diagrama da água. Kalichevsky *et al.*, 1995.

propriedades latentes no diagrama da água permite alargar as possibilidades da técnica de HPP. A pressurização a temperaturas inferiores a zero é um tratamento já aplicado no processamento de produtos sensíveis à temperatura, como por exemplo, produtos marinhos consumidos crus (Cheftel *et al.*, 2002), dos quais o salmão fumado é um exemplo. Este produto está associado aos patogénicos *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum* do tipo E e apresenta-se ainda como um produto de fácil deterioração por ação enzimática, sendo obtidos bons resultados através das novas tecnologias de pressurização a temperaturas baixas (Lakshmanan *et al.*, 2003).

4.2. Alta Pressão e pH

A acidificação das amostras, sujeitas a tratamento por alta pressão, tem demonstrado aumentar a eficiência de inativação de bactérias (Ross *et al.*, 2003). Em *Listeria monocytogenes* ATCC19117, tratada com 300 MPa por 10 minutos a 25 °C, verificou-se uma redução de 8 Log a pH de 4 enquanto a pH neutro não houve inativação significativa (Koseki e Yamamoto, 2006). Trabalhos independentes, com diferentes formas vegetativas, corroboram estes resultados demonstrando maior eficiência de inativação quando o pH da amostra é manipulado para valores na gama ácida (Alpas *et al.*, 2000; Daryaei *et al.*, 2010).

A pH baixo, a germinação de endosporos durante o tratamento é reduzida. No entanto, estes tornam-se mais sensíveis à pressão devido a diminuição da troca de catiões como Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} e Mn^{2+} . Este efeito constitui, portanto, um fator coadjuvante à inativação de bactérias esporuladas por alta pressão (Wuytack e Michiels, 2001). Apesar disso, em bactérias acidófilas produtoras de esporos, como é o caso de *Bacillus coagulans* e *Alicyclobacillus acidoterrestris*, o baixo pH pode induzir a germinação de esporos (Vercammen *et al.*, 2012).

A diminuição de pH parece não ter qualquer efeito modulatório na inativação de leveduras e fungos por alta pressão (Reyns *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2003; Daryaei *et al.*, 2010). Este facto pode estar relacionado com a maior resistência destes microrganismos a valores baixos de pH. Comparativamente com maioria das bactérias, leveduras e fungos são capazes de ocupar nichos ecológicos com maior acidez como fruta e alimentos fermentados (Reyns *et al.*, 2000; Adams e Moss, 2008).

4.3. Alta pressão e atmosfera de CO₂

A aplicação de alta pressão num ambiente rico em dióxido de carbono tem como efeito uma intensificação dos efeitos antimicrobianos deste último composto (Erkmen, 2000; Erkmen, 2001; Erkmen e Karaman, 2001). As pressões envolvidas nestas aplicações são mais baixas do que as normalmente utilizadas para inativação por pressurização, ficando geralmente abaixo dos 50 MPa (Raso e Barbosa-Cánovas, 2003). A diminuição de pH verificada nas amostras, após pressurização em atmosfera de CO₂, sugere a solubilização deste último. Sob pressão, as moléculas de CO₂ podem atravessar a membrana citoplasmática criando um pH interno muito baixo que vai causar a inativação do microrganismo (Erkmen e Karaman, 2001). Testes de adaptação da técnica para um modo de operação contínuo em vez de pressurização *batch* mostraram-se muito promissores, garantindo elevados níveis de letalidade em várias matrizes alimentares (Parton *et al.*, 2007).

Resultados de inativação igualmente interessantes foram conseguidos para *Escherichia coli* ATCC11775 e *Staphylococcus aureus* 1.2465 quando a pressurização ocorreu em atmosfera não modificada, mas em que o CO₂ foi previamente dissolvido nas amostras (Wang *et al.*, 2010). A dissolução de CO₂ numa fase aquosa conduz à formação de ácido carbónico (HCO₃), cuja dissociação proporciona iões de hidrogénio, carbonato e bicarbonato. Assim, a ação do dióxido de carbono, vai causar uma alteração de pH interno análoga à que ocorre na pressurização em atmosfera enriquecida em CO₂.

4.4. Alta pressão e agentes antimicrobianos

Grande parte dos aditivos utilizados em alimentos com o objetivo de aumentar a sua estabilidade são substâncias antimicrobianas (Søltoft-Jensen e Hansen, 2005). Nos últimos anos, aditivos artificiais têm vindo a perder interesse, sendo substituídos por moléculas naturais produzidas por animais, plantas, ou pelas designadas bacteriocinas produzidas por microrganismos (Gould, 1996).

A sinergia entre alta pressão e compostos antimicrobianos baseia-se no facto de exposições subletais à pressão tornarem os microrganismos mais susceptíveis à ação destes

compostos. Assim, a ação combinada destes dois agentes, aumenta a eficiência de inativação a pressões mais baixas (Masschalck *et al.*, 2001). A nisina é um péptido de síntese não ribossomal (bacteriocina) muito explorado em aplicações combinadas com alta pressão. Apresenta bons resultados de inativação, não só em modelos experimentais (meios tamponados) como também em matrizes alimentares (Yuste *et al.*, 2002; Arqués *et al.*, 2005; Black *et al.*, 2005). A nisina A, produzida naturalmente, é a única bacteriocina aprovada para uso comercial em muitos países (Cleveland *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2011). Outras bacteriocinas têm, no entanto, sido testadas para aplicações combinadas com alta pressão.

A adição de bactérias ácido-láticas produtoras de bacteriocinas pode ser interessante em alimentos dependentes de fermentação láctica, em que são adicionadas culturas iniciadoras para acelerar a reacção (Ennahar *et al.*, 2000; Drider *et al.*, 2006). A título de exemplo verificou-se que o uso de um extrato antimicrobiano produzido por *Lactobacillus casei* OSY-LB6A demonstrou ser efetivo na redução de viabilidade de estirpes de *Listeria monocytogenes* com diferentes graus de resistência à pressão (Chung e Yousef, 2010).

Verifica-se também que bacteriocinas que normalmente não causam qualquer efeito em bactérias de Gram negativo, em combinação com alta pressão, induzem uma redução significativa da viabilidade. Este efeito está relacionado com danos causados pela pressão a nível membranar que fragilizam as células e as tornam mais sensíveis às bacteriocinas (Kalchayanand *et al.*, 2004).

5. Listeriose como toxico-infecção alimentar

A listeriose, denominação da infeção provocada por algumas espécies de *Listeria*, é reportada principalmente em países industrializados (Posfay-Barbe e Wald, 2009), tendo no entanto, baixa incidência em humanos. No mundo são contabilizados cerca de 7 casos por milhão de habitantes, por ano. Esta infeção acarreta, no entanto, graves consequências, podendo mesmo ser fatal (Lecuit, 2007). Um estudo de 2006 sobre a situação portuguesa,

concluiu que em 2003 a incidência de listeriose foi de 1,4 casos por cada milhão de habitantes (Almeida *et al.*, 2006).

Os grupos populacionais onde se manifesta tanto maior prevalência de listeriose como maior risco de infecção são as mulheres grávidas, principalmente no último trimestre quando a gravidez se encontra associada a imunossupressão (Lecuit, 2007), os recém-nascidos (Acheson, 2000), indivíduos imuno-comprometidos, designadamente, seropositivos, portadores de hemopatias, transplantados, doentes oncológicos, portadores de hepatopatias, hemodialisados, portadores de próteses das válvulas cardíacas, diabéticos ou alcoólicos (Kuntzer *et al.*, 2004) e ainda indivíduos na faixa etária de idade superior a 65 anos (European Centre for Disease Prevention and Control, 2011; Todd e Notermans, 2011).

O processo infeccioso conduzido por *Listeria monocytogenes* pode ocorrer numa versão leve, não invasiva, ou numa forma severa, existindo invasão de tecidos. Esta última está relacionada com elevada taxa de mortalidade entre as pessoas afectadas (Rocourt *et al.*, 2000; Roberts e Wiedmann, 2003).

A listeriose está relacionada com patologias de vários órgãos devido ao carácter de patógeno intracelular de *Listeria monocytogenes*. A ocorrência de listeriose não invasiva manifesta-se através de gastroenterite associada a febre, diarreia e vômitos ou infecções cutâneas, com um período de incubação de 1 a 7 dias. Estes casos são de difícil diagnóstico, podendo mesmo haver portadores assintomáticos (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007; Warriner e Namvar, 2009).

Em mulheres grávidas, os principais sintomas são febre, com temperaturas entre os 38 e os 41 °C, quadros clínicos semelhantes a gripe (cefaleias, mialgias e calafrios), gastroenterite (diarreias e dores abdominais), apendicite, pielonefrite ou pneumopatia. Pode, eventualmente, existir redução dos movimentos e alteração do ritmo fetal (Rocourt *et al.*, 2000; Deguelte *et al.*, 2004). A infecção pode desencadear partos prematuros, morte fetal, aborto ou infecção do recém-nascido, estando associadas a elevadas taxas de mortalidade neonatal (Le Monnier e Leclercq, 2009).

Relativamente a *Listeria monocytogenes*, a dose mínima susceptível de causar doença em humanos é ainda desconhecida. Enquanto que em alguns países existe tolerância zero, isto é, os alimentos devem apresentar total abstenção do patógeno, noutros, e dependendo das características do alimento, este requisito é considerado

demasiado restritivo e baixas doses podem ser aceitáveis (Codex Committee on Food Hygiene, 1999).

As normas da União Europeia (Regulamento (CE) Nº 2073/2005) estabelecem limites de segurança relativos ao patogénico *Listeria monocytogenes* de acordo com três categorias de alimentos:

- Produtos prontos para consumo, destinados a lactentes ou para fins medicinais específicos: nestes alimentos, é requerida a ausência de *L. monocytogenes* em 25 g de amostra.
- Alimentos favoráveis ao crescimento de *L. monocytogenes*: nestes casos solicita-se tolerância zero antes do produto em causa deixar a unidade de produção/processamento e menos de 100 UFC/g, durante o tempo de vida útil dos produtos, em fase de comercialização.
- Alimentos prontos para consumo, com condições pouco favoráveis ao desenvolvimento de *L. monocytogenes*: o controlo é feito nos produtos em comercialização, devendo o teor ser inferior a 100 UFC/g.

Nos Estados Unidos da América, a legislação vigente é muito mais rígida. Os testes de detecção são efetuados em amostras de 50 g. A presença de *Listeria monocytogenes* é considerada adulteração alimentar e conduz à rejeição do género alimentício (Jay *et al.*, 2005).

6. O género *Listeria*

6.1. Taxonomia

O género *Listeria* pertence à ordem *Bacillales* na família *Listeriaceae* (Tabela 2). Estudos taxonómicos com base em sequenciação de rRNA 16S e 23S demonstraram que *Listeria* é um género filogeneticamente próximo dos géneros *Brochothrix*, com o qual forma a família *Listeraceae*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*,

Tabela 2. Taxonomia de *Listeria*^a

Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordem	Bacillales
Família	Listeriaceae
Género	<i>Listeria</i>

^a Adaptado de Winn *et al.*, 2006

Staphylococcus e *Streptococcus* (Collins *et al.*, 1991; Sallen *et al.*, 1996).

Até 2010, o género *Listeria* compreendia seis espécies, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri*, entre as quais duas patogénicas: *Listeria monocytogenes*, causador de doença em animais e humanos e *L. ivanovii*, causadora de doença em animais, e só muito raramente em humanos (Guillet *et al.*, 2010). A designação de listeriose é aplicada à doença causada por qualquer destas duas espécies (Khelef *et al.*, 2006; Slaghuis *et al.*, 2007; Guillet *et al.*, 2010).

Muito recentemente, quatro novas espécies foram isoladas, descritas e inseridas neste género: *Listeria marthii* (Graves *et al.*, 2010); *Listeria rocourtiae* (Leclercq *et al.*, 2010); *Listeria weihenstephanensis* (Halter *et al.*, 2013) e *Listeria fleischmannii* (Bertsch *et al.*, 2013).

6.2. Características morfológicas e estruturais

As espécies do género *Listeria* (Figura 8) apresentam células de Gram positivo com dimensões de 0,4-0,5 µm de largura e 1-1,5 µm de comprimento. Têm forma de bastonete podendo formar cadeias. Em esfregaço, podem apresentar formas cocóides. Em culturas antigas podem-se desenvolver filamentos de maior comprimento (> 6 µm) podendo também algumas células apresentar resposta atípica à coloração de Gram (McLauchun e Rees, 2009).

Possuem entre 2 a 6 flagelos peritricos que lhes conferem uma mobilidade celular característica (*tumbling*) entre 20 e 25 °C. Não produzem cápsula nem endósporos (Knapp, 2006).

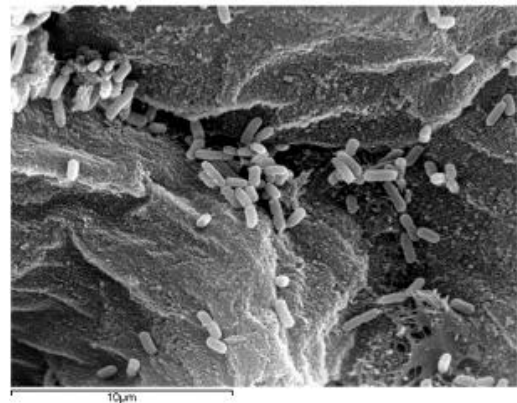


Fig. 8. Presunto cozido inoculado com *Listeria monocytogenes* Scott A (CIP 103575). Microscópio electrónico de varrimento (SEM). Ampliação 5000 x. A barra representa 10 µm. Hierro *et al.*, 2011.

6.3. Características culturais

As colônias deste género, obtidas após incubação entre 24 a 48 horas, em meio *Tryptic Soy Agar* (Figura 9), são tipicamente circulares, viscosas, não pigmentadas e translúcidas, com superfície lisa, convexidade pouco marcada, margem inteira e diâmetro entre 0,5 e 1,5 mm (McLauchun e Rees, 2009). Em colônias de 3 a 7 dias, o diâmetro aumenta para um valor compreendido entre 3-5 mm. A sua forma pode desenvolver algumas irregularidades e a aparência torna-se mais opaca (McLauchun e Rees, 2009).

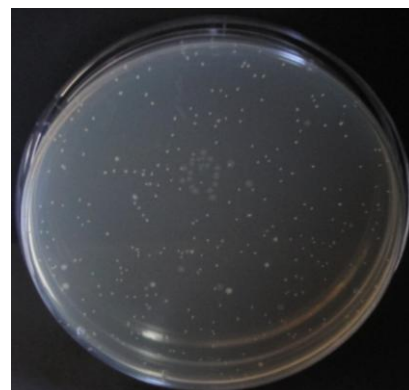


Fig. 9. Colônias de *Listeria innocua* NCTC 10528 em substrato de agar.

O cultivo de *Listeria* em agar nutritivo dá origem a colônias que desenvolvem, sob intensidade luminosa normal, uma cor azulada. Apresentam um brilho azul esverdeado se visualizadas ao microscópio, sob luz oblíqua (ângulo de incidência de luz 45° e 135° de ângulo de visualização) designada por iluminação de Henry (Schuchat *et al.*, 1991; Ryser e Donnelly, 2002; Yousef e Carlstrom 2003).

6.4. Características bioquímicas

As espécies de *Listeria* produzem, tipicamente, resultados positivos para os testes vermelho de metilo, catalase e Voges Proskauer e negativos para oxidase, indol e sulfureto de hidrogénio (H₂S). Hidrolizam esculina, mas não ureia e gelatina. Produzem ácido a partir de glucose e outros açúcares (Holf, 1996).

A diferenciação entre espécies é feita com base na atividade hemolítica (capacidade de lise dos glóbulos vermelhos) para a qual *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* são positivas, produzindo uma zona de β -hemolise em agar de sangue. Esta característica é mais pronunciada em *L. ivanovii*, podendo distinguir-se duas zonas de lise em volta das colônias (Bhunja, 2008). O teste CAMP (Christie–Atkins–Munch–Petersen) é utilizado para distinguir as espécies hemolíticas. Deteta reações sinérgicas das hemolisinas das

espécies de *Listeria* com a β toxina de *Staphylococcus aureus* e com um exofactor de *Rhodococcus equi*. *L. monocytogenes* e *L. seeligeri* são positivas para o teste CAMP com *S. aureus*, mas negativas para o teste CAMP com *R. equi*, enquanto que para *L. ivanovii* se verifica o inverso (Schuchat *et al.*, 1991; Jay *et al.*, 2005). A produção de ácido a partir de diferentes açúcares é também testada. Neste âmbito, verifica-se que apenas *L. monocytogenes* é positiva para a ramnose (Holf, 1996).

6.5. Nutrição

Os requerimentos nutricionais para o crescimento de espécies de *Listeria* são hidratos de carbono, os aminoácidos cisteína, glutamina, isoleucina, leucina e valina e as vitaminas do complexo B biotina, riboflavina, tiamina e ácido tióctico (Glaser *et al.*, 2001).

Todas as espécies são capazes de utilizar glucose com formação de L(+)-ácido láctico. Em contraste com a maioria das bactérias de Gram positivo, *Listeria* consegue crescer em agar MacConkey, resistindo aos sais biliares (Jay *et al.*, 2005). A adição de ferro e aminoácidos arginina, histidina, metionina e triptofano estimulam o crescimento de *Listeria monocytogenes* (Khelef *et al.*, 2006).

6.6. Crescimento

As espécies de *Listeria* são aeróbias e anaeróbias facultativas, crescendo bem no laboratório em condições de aerobiose nos meios correntemente utilizados (Slaghuis *et al.*, 2007). Encontram-se bem adaptadas à sobrevivência no intervalo compreendido entre 1 e 45 °C, sendo a sua temperatura ótima de crescimento entre os 30 e os 37 °C (Holf, 1996; McLauchun e Rees, 2009). As células são destruídas à temperatura de 60 °C. Em *Listeria monocytogenes*, a exposição a stresse térmico conduz a modificações na composição de ácidos gordos da membrana citoplasmática (Khelef *et al.*, 2006). Uma das características particulares de *L. monocytogenes* é a sua capacidade de proliferação a baixas temperaturas (4 °C), tal como representado na figura 10, o que constitui uma dificuldade acrescida no controlo deste microrganismo em alimentos. Alguns mecanismos subjacentes à tolerância

ao frio são: a) alterações membranares com remodelação dos ácidos gordos constituintes dos fosfolípidos em termos de grau de saturação e comprimento das cadeias; b) síntese de proteínas de choque ao frio, proteínas de aclimatização ao frio e chaperones de proteases possivelmente envolvidas na degradação de material proteico anormal ou danificado; e c) acumulação de solutos compatíveis (Gandhi e Chikindas, 2007). A mobilidade das células é também sensível à temperatura, uma vez que *L. monocytogenes* apresenta mobilidade a 20 °C, mas não a 37 °C devido a repressão na expressão da flagelina a esta temperatura (McLauchun e Rees, 2009).

Listeria sobrevive no intervalo de pH de 4 a 9,5, estando o pH ótimo próximo de 7 (Jay *et al.*, 2005).

Algumas espécies de *Listeria* resitem a 10% de NaCl, sendo o seu crescimento ótimo a 0,5% (Khelef *et al.*, 2006). No entanto, e ao contrário do que sucede para *Enterococcus*, não se verifica crescimento quando expostas a 0,02% de azida sódica. Estirpes virulentas conseguem crescer na presença de 40 % (v/w) de bÍlis, pois expressam uma hidrolase de sais biliares (Dussurget *et al.*, 2002).

6.7. Dispersão

Listeria é um género ubÍquo na natureza. Sendo saprófitas, estas espécies ocorrem naturalmente em material vegetal em decomposição (Hain *et al.*, 2007). Podem ser isoladas em solo, Água, trato gastrointestinal e fezes de animais, esgotos, poeira, lamas e alimentos (Khelef *et al.*, 2006; Allerberger, 2007; Bhunia, 2008). Este género aparece normalmente associado a bactÍrias corineformes e *Brochothrix spp.* (Jay *et al.*, 2005).

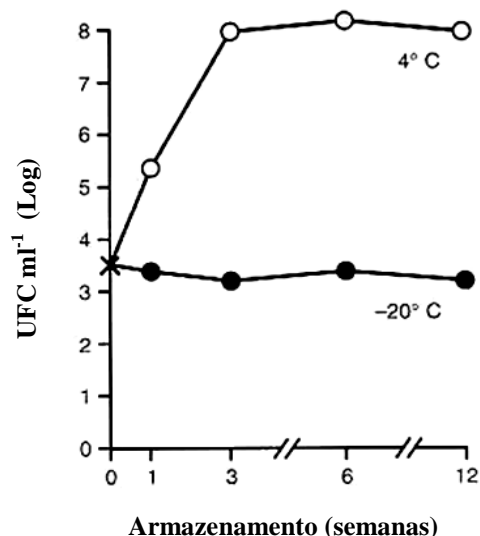


Fig. 10. Crescimento de *Listeria monocytogenes* a temperaturas de refrigeração ou congelação Holf, 1996.

Em alimentos, *L. monocytogenes* encontra-se mais frequentemente em produtos crus, tanto de origem animal como vegetal. Em alimentos cozinhados, a sua presença pode dever-se a contaminação pós-processamento (Codex Committee on Food Hygiene, 1999).

Os veículos de transmissão nos principais surtos de listeriose na América do Norte e Europa, entre 1979 e 2008, foram vegetais crus, leite cru e pasteurizado, queijo, paté, camarão, carne, cachorros quentes e truta fumada (Warriner e Namvar, 2009).

6.8. *Listeria innocua* como modelo biológico de *Listeria monocytogenes*

Listeria innocua é a espécie filogeneticamente mais próxima da congénere *Listeria monocytogenes* (Hain *et al.*, 2006). As duas espécies apresentam grande semelhança de características quer a nível bioquímico e de condições de crescimento quer a nível de resistência a fatores como acidez, dessecação, aquecimento e concentração de sais (Buzrul e Alpas, 2004).

A grande vantagem na utilização de *Listeria innocua* como organismo modelo de *Listeria monocytogenes* é o facto de a primeira não apresentar, no seu genoma, a ilha de patogenicidade 1 de *Listeria* (LIPI-1) (Figura 11). O conjunto de determinantes de virulência presentes nesta região do genoma estabelece o carácter de patógeno intracelular. Assim, *Listeria innocua* é um organismo que pode ser manipulado de forma segura em trabalhos de investigação, sendo muito utilizada como modelo de *Listeria monocytogenes* nas mais diversas investigações relacionadas com a indústria alimentar. Inativação por pulsos elétricos (Sepulveda *et al.*, 2005), pelo calor (Miller *et al.*, 2011), alta pressão hidrostática (Buzrul e

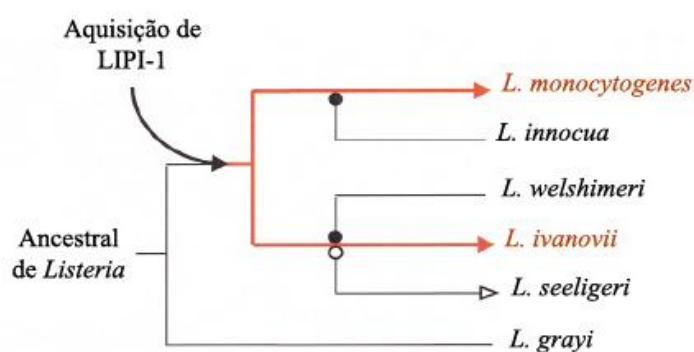


Fig. 11. Modelo de evolução de LIPI-1 entre as espécies de *Listeria*. As linhas vermelhas indicam a conservação funcional de LIPI-1. Os círculos a preto, a perda deste fragmento genómico e o círculo branco uma versão não funcional desta ilha. As dimensões entre ramos não refletem distâncias genéticas. Vázquez-Boland *et al.*, 2001.

Alpas, 2004; Saucedo-Reyes *et al.*, 2009), termo-sonicação (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2009), pulsos luminosos de alta intensidade (Palgan *et al.*, 2011), sensibilização com agentes antimicrobianos (Lehrke *et al.*, 2011; Iturriaga *et al.*, 2012), formação de biofilmes (Perni *et al.*, 2006), testes de recuperação a vários stresses (Miller *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2009) são alguns exemplos.

7. Objetivos

O conceito de *tecnologia de barreiras* está associado à aplicação de agentes coadjuvantes no processo de tratamento por alta pressão. Tendo em perspectiva um cenário futuro de aplicação de HPP na inativação de *Listeria* em alimentos-veículo, este trabalho teve como objetivos avaliar o efeito da combinação de vários agentes na eficiência de inativação por alta pressão de *Listeria innocua*, usada como modelo biológico da espécie patogénica *L. monocytogenes*. Em concreto, pretendeu-se avaliar o efeito da variação do pH ou da temperatura na eficiência de inativação.

1. Material biológico

A estirpe *Listeria innocua* (10528, National Collection of Type Cultures, UK; NCTC) utilizada no presente estudo foi cedida pela coleção de culturas da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa.

A partir da cultura de *Listeria innocua* NCTC 10528 recebida, uma colónia isolada foi selecionada e inoculada em 50 mL de Tryptic Soy Broth (TSB, Liofilchem®). A incubação decorreu a 37 °C com agitação de 170 rpm (Optic Ivymen System®) durante 24 horas. Esta nova cultura foi distribuída em alíquotas 1 mL, adicionadas de 20% de glicerol, previamente esterilizado e conservadas a -80 °C (suspensão-*stock*).

As culturas de conservação a médio-prazo (aproximadamente 30 dias) foram obtidas por inoculação da suspensão-*stock*, recorrendo à técnica de riscado, de placas de Tryptic Soy Agar (TSA, Liofilchem®). As placas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas, sendo posteriormente conservadas no frigorífico a 4 °C. Colónias bem isoladas destas culturas foram repicadas para meio líquido para a obtenção de culturas frescas antes de cada ensaio.

2. Perfil de crescimento de *Listeria innocua* em meio líquido

A cinética de crescimento de *Listeria innocua* NCTC 10528, em meio líquido, foi caracterizada por forma a assegurar que nos ensaios de HPP fossem utilizadas suspensões celulares em início de fase estacionária. A suscetibilidade a fatores de stresse pode variar consideravelmente entre as diferentes fases de crescimento e a fase estacionária corresponde, de forma geral, à menor suscetibilidade a fatores de inativação.

A partir das culturas conservadas no frigorífico, selecionou-se uma colónia bem isolada com a qual se inocularam 50 mL de TSB. Esta cultura foi incubada a 37 °C e 170 rpm durante 20 horas, ao fim das quais apresentava já turvação significativa. Uma alíquota de 50 µL desta cultura foi inoculada em 50 mL de TSB para obter uma nova cultura que se incubou nas mesmas condições. Desta última, retiraram-se 200 µL de cultura como inóculo para 200 mL de TSB. A nova cultura foi submetida à mesma temperatura e

agitação que as antecedentes. Durante a incubação, a densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) foi medida de hora a hora (espectrofotômetro Dynamica HALO DB-20 UV-Vis Double Beam SpectrophotometerTM), colocando 2 mL de cultura em cuvetes descartáveis (VWR[®]) com 1 cm de percurso ótico. Em cada momento de leitura, procedeu-se à calibração do aparelho usando TSB não inoculado como branco. Foram analisadas 3 réplicas da amostra, sendo o valor da DO_{600} , em cada momento, calculado por média amostral. Sempre que as leituras de DO_{600} assumiram valores superiores a 1 procedeu-se à diluição da cultura com TSB não inoculado. Posteriormente, fez-se a correção da nova leitura para o fator de diluição.

Em paralelo com a determinação da DO_{600} , procedeu-se à quantificação do teor de células viáveis na cultura. Este valor foi estimado pela concentração de Unidades Formadoras de Colónias (UFC mL⁻¹). De 2 em 2 horas, alíquotas de 1 mL foram recolhidas e diluídas em série em soluto de Ringer (Merck). Triplicados das diluições selecionadas foram semeados por incorporação em TSA. As culturas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas. Efetuou-se a contagem de colónias nas réplicas da diluição mais conveniente. As contagens obtidas foram corrigidas para o fator de diluição e o valor de UFC mL⁻¹, em cada momento, foi calculado como a média das réplicas.

Foram construídas três curvas de crescimento, correspondentes a três ensaios independentes. A curva média representa o logaritmo do valor médio de DO_{600} em função do tempo de incubação, no conjunto dos três ensaios.

3. Processamento por alta pressão

3.1. Equipamento de alta pressão

Os tratamentos de alta pressão foram efectuados no equipamento de alta pressão Unipress Equipment, Model U33[®] (Institute of High Pressure Physics Unipress Equipment Division, Serial Number 1139/06).

Este equipamento, construído em 2006, apresenta uma pressão máxima de operação de 700 MPa e funciona num espectro de temperaturas definido entre -20 °C e 100 °C, regulado por um termostato.

O vaso de pressurização tem 35 mm de diâmetro por 100 mm de altura, apresentando uma capacidade útil máxima de 100 mL. O fluido de transmissão de pressão utilizado é constituído por uma mistura de propilenoglicol (DowcalTM, Dow) e água, numa razão de 3:2.

3.2.Preparação de culturas em fase estacionária

As culturas utilizadas antes de cada ensaio de inativação foram obtidas a partir dos riscados de conservação mantidos a 4 °C. Uma colónia isolada foi repicada para 50 mL de TSB. A cultura foi incubada a 37 °C, durante 20 horas com agitação a 170 rpm. Desta cultura, recolheu-se uma alíquota de 200 µL com a qual se inocularam 200 mL de TSB. A nova cultura foi incubada nas mesmas condições que a anterior, durante 12 horas, que foi o tempo estabelecido nos ensaios preliminares (curvas de crescimento) como o necessário para que fosse atingida a fase estacionária.

No final da incubação, confirmou-se a fase de crescimento da cultura pelo valor DO₆₀₀ de modo idêntico ao anteriormente descrito. O valor de referência de DO₆₀₀ nas culturas de trabalho foi de 1,4-1,6 unidades de absorvância, correspondendo a um teor de células viáveis de cerca de 10⁹ UFC mL⁻¹.

3.3. Ensaios de pressurização

Por cada condição a testar, foi utilizada uma amostra da cultura de trabalho constituída por 9 réplicas. Cada réplica (500 µL de cultura) foi acondicionada num microtubo maleável (X1000 Microtube PE 0,5 mL BECKMANN[®]), previamente esterilizado por luz ultravioleta (UV) durante 2 horas. O enchimento dos tubos foi efectuado de modo a que não ficassem retidas bolhas de ar no seu interior.

No caso dos ensaios onde se estudou a influência do pH na inativação (secção 3.3.3. deste capítulo), antes de encher os microtubos procedeu-se ainda a uma pré-diluição da cultura (1:10) para cada uma das condições (pH 4, 7 e 10) em soluto de Ringer cujo pH foi previamente ajustado por adição de HCl ou NaOH.

Os microtubos foram hermeticamente selados com parafilme (Parafilm[®]) e agrupados em conjuntos de três. Cada conjunto foi colocado num saco de polietileno que foi preenchido com água estéril destilada e hermeticamente selado. Os três sacos, correspondentes às 9 réplicas, foram reunidos e colocados num segundo saco de polietileno que se encheu também com água e foi posteriormente selado. Durante a selagem dos dois sacos evitou-se a retenção de bolhas de ar. Cada amostra (saco com 9 réplicas) foi pressurizada tendo em conta as variáveis de estudo do ensaio em causa e objetivos, as quais serão abaixo esclarecidas. Depois de concluída a pressurização, as amostras foram retiradas do vaso de pressurização e colocadas em gelo fundente.

3.3.1. Cinética de inativação de *Listeria innocua* em função da pressão

O ensaio preliminar de inativação por HPP teve como objetivo selecionar as pressões mais indicadas para aplicar em ensaios subsequentes. Foram testados seis valores de pressão: 100, 200, 300, 400, 500 e 600 MPa. O processamento foi efetuado à temperatura ambiente (não controlada), durante 5 minutos, e os processos de compressão e descompressão foram conduzidos a uma taxa intermédia (predefinição do equipamento, por defeito).

3.3.2. Efeito da temperatura

Para avaliar o efeito da temperatura, durante a pressurização, na eficiência de inativação de *L. innocua*, foram realizados ensaios a temperatura ambiente controlada (20 °C) e em condições de temperatura inferior à temperatura ambiente: 4 °C (temperatura normalmente utilizada nos processos refrigeração durante o armazenamento alimentar) e 10 °C (ponto intermédio entre as temperaturas anteriores).

O tratamento realizou-se durante 5 minutos, sendo a pressão aplicada de 300 MPa com uma taxa de compressão/descompressão intermédia. Pressão, segundo a qual, de acordo com o ensaio preliminar, eram infligidos danos subletais nas células.

3.3.3. Efeito do pH

Para avaliar a influência do pH, durante a pressurização, na eficiência de inativação de *L. innocua*, foram preparadas amostras com pH ácido (4), neutro (7) e básico (10). Os valores de pH ácido e básico escolhidos constituíam, respetivamente, o limite inferior e superior da gama de pH onde *Listeria* consegue crescer. A amostra onde o pH era de 7 foi considerada como controlo, uma vez que, constituía o valor de pH ótimo para o crescimento do microrganismo. A pressurização efetuou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente (não controlada) e a uma taxa de compressão/descompressão intermédia.

3.4. Determinação da concentração de células viáveis

A determinação do teor de células viáveis (UFC mL⁻¹) foi efetuada nas amostras sujeitas a tratamento com pressão e nos controlos não pressurizados. Uma alíquota de 100 µl de cada réplica foi sujeita a diluição em série e as diluições mais apropriadas foram semeadas, por incorporação, em TSA. As culturas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas. No final da incubação procedeu-se à contagem de colónias.

De modo a obter uma estimativa do teor de células sobreviventes, calculou-se a média das contagens de colónias, nas réplicas da diluição mais adequada, tanto para controlos como para amostras representativas dos diferentes tratamentos. Este valor foi corrigido para o fator de diluição e os resultados foram expressos em UFC mL⁻¹.

O fator de inativação (FI) correspondente a cada tratamento foi determinado pelo logaritmo decimal da razão entre o número de UFC mL⁻¹ nos controlos não pressurizados (N₀) e amostras (N_i), segundo a expressão: $FI = \log_{10} (N_0/N_i)$.

3.5. Tratamento estatístico

Todas as condições experimentais foram testadas em três ensaios independentes. O FI correspondente a cada condição foi calculado como a média dos valores de FI em cada um dos ensaios.

A análise estatística foi efetuada com o *software* SPSS Statistics 17.0. A existência de diferenças significativas entre ensaios e condições foi avaliada por análise de variância simples (One-way ANOVA). Sempre que a igualdade foi rejeitada, os dados foram analisados segundo o método de Turkey para verificar quais tratamentos significativamente diferentes entre si.

1. Perfil de crescimento de *Listeria innocua* em meio líquido

A avaliação do crescimento de *Listeria innocua* NCTC 10528 a 37 °C (Figura 12) permitiu definir o tempo de incubação correspondente à transição da fase exponencial para a fase estacionária. As culturas mantiveram-se em fase exponencial durante cerca de 8

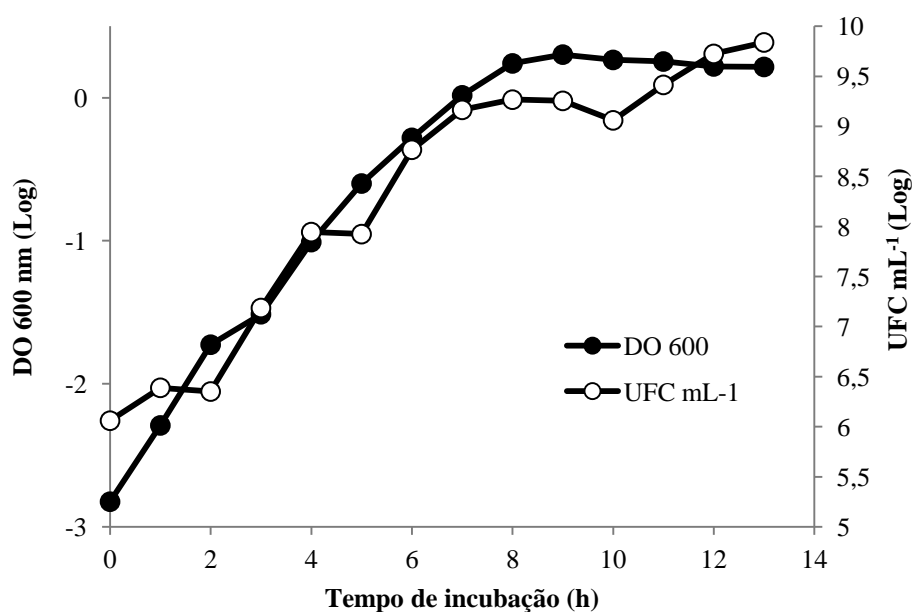


Fig. 12. Cinética de crescimento de *Listeria innocua* NCTC 10528 com base em densidade ótica e UFC mL⁻¹ durante 13 horas.

horas. Como era esperado, verificou-se uma correlação significativa entre o teor de células viáveis, dado pela concentração de UFC mL⁻¹, e a densidade ótica da cultura (coeficiente de correlação de Spearman de 0,8). A fase estacionária iniciou-se após 8 horas e as culturas mantiveram-se em fase estacionária até às 13 horas de incubação, período em que foram interrompidos os ensaios. Por forma a garantir que a cultura utilizada na preparação de amostras dos ensaios posteriores se encontrava em fase estacionária, foi estabelecido um período de incubação de 12 horas.

2. Cinética de inativação de *Listeria innocua* em função da pressão

A utilização de uma gama de pressões compreendida entre 100 e 600 MPa permitiu caracterizar a cinética de inativação de *Listeria innocua* NCTC 10528, para tratamentos de 5 minutos (Figura 13).

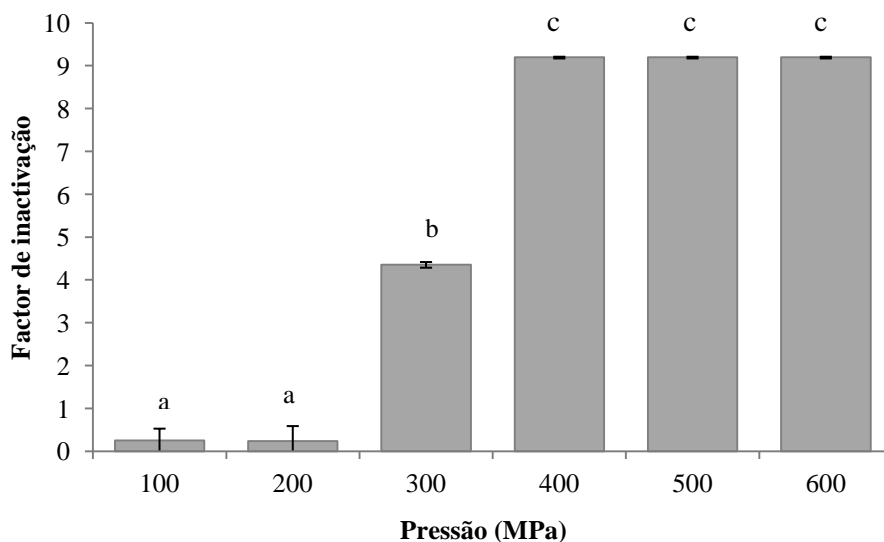


Fig. 13. Inativação de *Listeria innocua* NCTC 10528 por HPP (5 min, $T \cong$ ambiente) a diferentes pressões. As barras de erro representam o desvio-padrão. Diferentes letras indicam diferenças com significância estatística ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos demonstram uma proporcionalidade direta entre inativação bacteriana e aumento da pressão aplicada, para o intervalo de pressões entre 200 e 400 MPa. Verificou-se que a pressões de 100 e 200 MPa não houve inativação significativa ($p > 0,5$). A aplicação das três pressões mais elevadas (400, 500 e 600 MPa) causou inativação total da cultura ($9,2 \text{ Log} \pm 0,02$). A pressão de 300 MPa correspondeu a um FI de $4,4 \pm 0,07$ que é um valor significativamente diferente dos obtidos com pressões mais baixas ou mais altas. Neste tratamento verificou-se a inativação de cerca de metade da população celular tendo sido este o valor de pressão considerado como mais interessante para os ensaios seguintes em que se pretendia avaliar o efeito de outros parâmetros na eficiência final de inativação.

3. Efeito da temperatura

Os ensaios de pressurização a 300 MPa, durante 5 minutos, a diferentes temperaturas (Figura 14) permitiram verificar um aumento da eficiência de inativação a temperaturas inferiores à temperatura ambiente. No entanto, os fatores de inativação calculados para os tratamentos a 4 e 10 °C não são significativamente diferentes ($p > 0,05$). Comparando os valores do FI, verifica-se que a inativação foi 1,85 vezes mais eficiente a 4 °C do que a 20 °C.

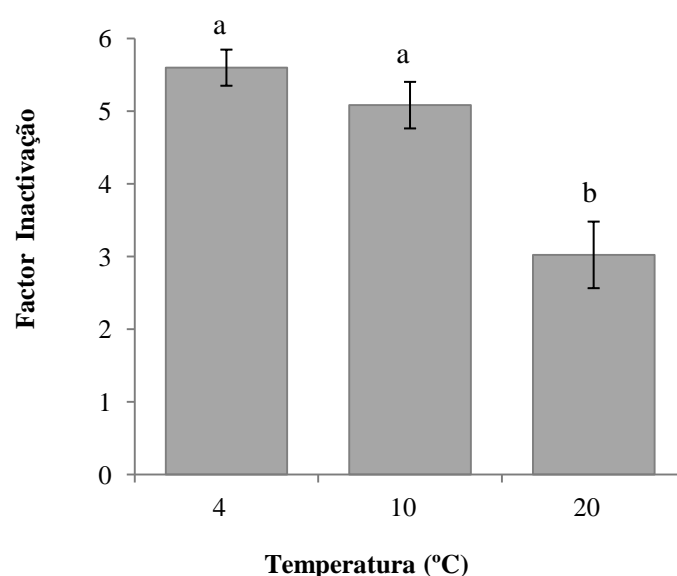


Fig. 14. Inativação de *Listeria innocua* NCTC 10528 por HPP (300 MPa, 5 min) a diferentes temperaturas. As barras de erro representam o desvio-padrão. Diferentes letras indicam diferenças com significância estatística ($p < 0,05$).

4. Efeito do pH

Os resultados obtidos nos ensaios em que a pressurização foi conduzida em suspensões celulares com diferentes valores de pH (Figura 15) indicam que não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre amostras de pH ácido e neutro. Nos dois casos, a

inativação obtida mostrou-se idêntica à verificada no ensaio preliminar para a mesma pressão. Em meio alcalino as células apresentaram menor suscetibilidade à inativação.

Os fatores de inativação em meio ácido ou neutro foram de $3,9 \pm 0,83$ - $4,3 \pm 0,85$, correspondendo a uma suscetibilidade cerca de 6 vezes superior à apresentada em meio alcalino.

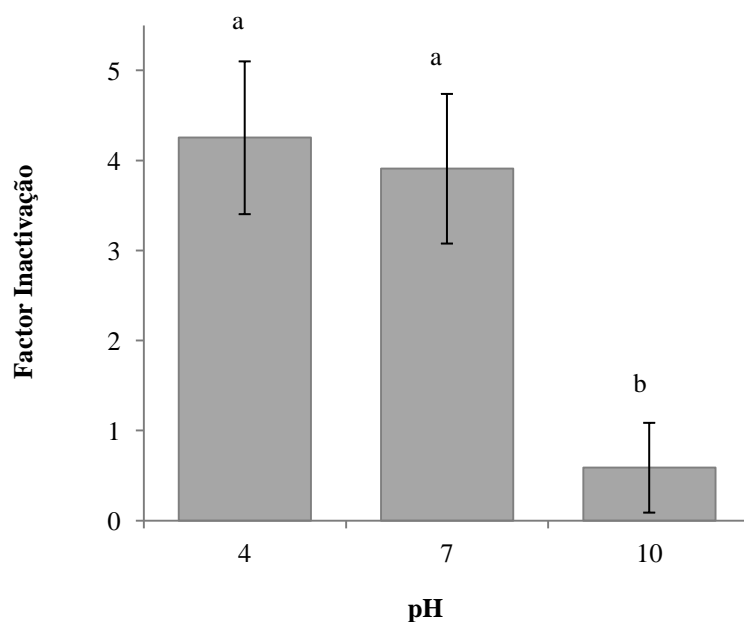


Fig. 15. Inativação de *Listeria innocua* NCTC 10528 por HPP (300 Mpa, 5 min, $T \cong$ ambiente) a diferentes níveis de pH. As barras representam o desvio-padrão. Diferentes letras indicam diferenças com significância estatística ($p < 0,05$).

1. Cinética de inativação de *Listeria innocua* em função da pressão

A análise preliminar do efeito da pressão na eficiência de inativação de *Listeria innocua* NCTC 10528 permitiu caracterizar a cinética de inativação deste organismo, em função da pressão, e assim, selecionar as condições de pressurização mais adequadas para os ensaios subsequentes. Nestes, o objetivo foi avaliar o efeito de fatores que podem afetar a eficiência de inativação, designadamente, a temperatura de processamento e o pH do meio de suspensão. Para tal, eram pretendidas condições em que não ocorresse inativação completa de modo a poder avaliar variações, na eficiência de inativação, através de variações no valor do fator de inativação. Para um tempo de aplicação constante, verificou-se que o fator de inativação aumentou com o valor da pressão, tal como descrito para diversos microrganismos (Wuytack *et al.*, 2002).

A maioria dos microrganismos em fase vegetativa é inativada por níveis de pressão compreendidos entre 400 e 600 MPa, à temperatura ambiente, com reduções na concentração de células viáveis de mais de 4 ordens de grandeza (Devlieghere *et al.*, 2004). No presente trabalho, verificou-se a inativação completa da estirpe ($IF = 9,2 \pm 0,02$) com pressões iguais ou superiores a 400 MPa o que coloca *Listeria innocua* NCTC 10528 numa gama intermédia de sensibilidade à pressão. A 300 MPa verificou-se uma inativação significativa ($IF = 4,4 \pm 0,07$), ainda que incompleta. Para os valores de pressão de 100 e 200 MPa não houve inativação estatisticamente significativa

A comparação entre resultados obtidos no presente trabalho e estudos análogos evidencia que os valores de inativação obtidos correspondem ao limite superior da gama relatada para várias estirpes de *Listeria innocua* e da sua congénere patogénica *Listeria monocytogenes* (Yuste *et al.*, 1999; Rademacher *et al.*, 2002; Black *et al.*, 2007b; Amina *et al.*, 2010; Muñoz-Cuevas *et al.*, 2013). No entanto, a comparação dos resultados é limitada pelo facto de se referirem a condições experimentais muito diferentes relativamente às matrizes utilizadas e que incluem, para além de substratos laboratoriais como tampão Tris (Rademacher *et al.*, 2002; Black *et al.*, 2007b) ou meio TSB suplementado (Muñoz-Cuevas *et al.*, 2013), matrizes alimentares naturais como leite (Black *et al.*, 2007b; Amina *et al.*, 2010) ou produtos cárneos (Yuste *et al.*, 1999). A matriz da amostra constitui um dos fatores intrínsecos mais relevantes na inativação de

microrganismos por alta pressão (Smiddy *et al.*, 2005), uma vez que são vários os constituintes que podem proporcionar um efeito protetor (Black *et al.*, 2011). No caso do leite, os minerais cálcio, magnésio, fosfato e ainda o ião citrato parecem proteger da inativação (Black *et al.*, 2007b). Muitos estudos evidenciam a variabilidade de resultados relacionada com a constituição da amostra na qual o microrganismo é inoculado. Diferenças de cerca de 3 Log foram registadas na redução de *Listeria innocua* ATCC 33090 a 300 MPa em sumo de kiwi e de ananás (Buzrul *et al.*, 2008). A redução bacteriana mais elevada, cerca de 4 Log, foi obtida em sumo de kiwi. A inativação de *Listeria monocytogenes* CTC 1034 é mais eficiente em presunto cozido do que em mortadela (Hereu *et al.*, 2013). O tratamento de células de *Listeria innocua* 4202 (coleção de culturas da Universidade de Cork) a 500 MPa em diferentes matrizes líquidas permitiu estabelecer um gradiente de sensibilidade decrescente traduzido na sequência PBS > tampão Tris > Leite > Leite + tampão Tris (Black *et al.*, 2007b). Assim, e de uma forma geral, os resultados de estudos realizados em matrizes complexas devem ser interpretados tendo em conta a composição da amostra (Balasubramaniam *et al.*, 2004).

Para além da composição do meio extracelular, a fase de crescimento das culturas sujeitas a pressurização é determinante na suscetibilidade evidenciada. A construção da curva de crescimento de *Listeria innocua* NCTC 10528 permitiu a seleção de um tempo de incubação que garantisse que a cultura tinha atingido a fase estacionária. Nesta fase, as células bacterianas apresentam resistência acrescida a vários fatores de stresse em geral (Balasubramaniam *et al.*, 2004), e para a pressão em particular (Mackey *et al.*, 1995; Saucedo-Reyes *et al.*, 2009). Assim, as amostras sujeitas a pressurização foram preparadas em condições de cultivo padronizadas e com tempo de incubação fixo de forma assegurar que se encontravam sempre em fase estacionária, apresentando assim os níveis máximos de resistência natural à pressão.

Com base nos resultados obtidos na primeira fase do trabalho, escolheu-se a pressão de 300 MPa para aplicar nos ensaios posteriores, uma vez que permitiria avaliar o efeito adjuvante ou antagónico de outros fatores para com a pressão.

2. Efeitos da temperatura

O efeito sinérgico entre alta pressão e temperaturas superiores à ambiental é frequentemente caracterizada por níveis mais elevados de inativação bacteriana (Patterson e Kilpatric, 1998; Alpas *et al.*, 1999; Chen e Hoover 2003; Ye *et al.*, 2012), sendo uma estratégia frequentemente utilizada na destruição de formas de resistência, como é o caso dos endósporos bacterianos (Lee *et al.*, 2002; Ardia, 2004; Mathys *et al.* 2009). A utilização de temperaturas inferiores à temperatura ambiente e superiores a zero tem sido relativamente menos estudada.

Os resultados do presente estudo mostram que *L. innocua* foi mais suscetível à inativação quando a pressurização foi conduzida abaixo da temperatura ambiente. Os resultados obtidos neste estudo mostram que a inativação de *Listeria innocua* NCTC 10528 em TSB foi bastante superior nos tratamentos a 4 e 10 °C, comparativamente com os tratamentos conduzidos 20 °C. Estudos realizados com *Listeria* inoculada em diferentes matrizes alimentares, designadamente, carne (Carlez *et al.*, 1993; Chen 2007), vegetais (Arroyo *et al.*, 1999) e leite (Gervilla *et al.*, 2000) confirmam a maior suscetibilidade à pressão a temperaturas baixas, independentemente da composição química do ambiente extracelular. Em carne, os níveis de inativação obtidos no tratamento a 4 °C foram apenas superados pelo tratamento a 50 °C (Carlez *et al.*, 1993). No tratamento de leite foram observados, no entanto, diferentes comportamentos consoante o microrganismo. Enquanto que *Lactobacillus helveticus* CECT 414, *Listeria innocua* CECT 910 e *Pseudomonas fluorescens* CECT 378, apresentaram maior inativação, quando submetidos a pressurização, a 4 °C do que a 25 °C, o contrário foi verificado para *Escherichia coli* CECT 405 e *Staphylococcus aureus* CECT 534 (Gervilla *et al.*, 2000).

Na origem da maior suscetibilidade à pressão a temperaturas baixas podem estar alterações moleculares das membranas. O aumento da pressão induz a passagem dos fosfolípidos de uma fase líquida-cristalina (fluida) para uma fase de gel (Winter e Dzwolak, 2005). Por conseguinte, a membrana torna-se mais rígida e consequentemente menos permeável, provocando perda de funções. A aplicação de baixas temperaturas *per se*, causa efeitos semelhantes (Casadei *et al.*, 2002; Russell, 2002). De facto, microrganismos barofílicos e psicofílicos apresentam adaptações que resultam de evolução convergente. Em qualquer dos casos, a resposta aos fatores de stresse pressão ou

temperatura resulta principalmente num aumento de fluidez proporcionada pelo aumento do rácio de fosfolípidos insaturados/saturados na membrana plasmática (Najjar *et al.* 2007; Winter e Jeworrek, 2009). No caso da adaptação à temperatura esta remodelação membranar designa-se adaptação homeoviscosa e inclui ainda a redução do comprimento das cadeias de ácidos gordos e a modificação dos padrões de ramificação das cadeias com passagem da forma iso (ponto de ramificação no penúltimo carbono da cadeia) para anteiso (ramificação no antepenúltimo carbono) (Hazel, 1995; Annous, 1997). O facto de diferentes agentes de stresse causarem danos equivalentes pode explicar as adaptações análogas e o carácter cumulativo dos danos causados por cada um dos fatores. Assim, a combinação de altas pressões e baixas temperaturas parece intensificar os danos celulares, permitindo que o nível de inativação pretendido seja atingido com valores de pressão mais baixos (Simonato *et al.*, 2006).

Listeria, como microrganismo psicrotrófico, pode apresentar, então, algumas adaptações que lhes são favoráveis quando expostas a pressão, mas que não são suficientes para prevenir os danos quando a temperatura baixa é usada como coadjuvante. Assim, regista-se um aumento na magnitude da inativação por pressurização a temperatura baixa, relativamente a organismos mais sensíveis aos efeitos diretos da pressão. As adaptações são mais marcadas quando o crescimento dos microrganismos psicrotróficos ocorre a baixas temperaturas, como as temperaturas de refrigeração (Edgcomb *et al.*, 2000; Najjar *et al.*, 2007), pelo que, a combinação de alta pressão e baixa temperatura pode ser especialmente útil para aumentar a eficiência de inativação de *Listeria* em alimentos preparados e conservados em frio como por exemplo carne, queijo e vegetais.

3. Efeito do pH

O estudo do efeito da pressurização, sob diferentes condições de pH, na inativação de *L. innocua* NCTC 10528, demonstrou menor suscetibilidade na gama alcalina, relativamente às condições ácida e neutra. Considerando que o valor de pH 10 se encontra acima do limite de tolerância do género *Listeria*, seria de esperar o efeito contrário, ou seja, um aumento da inativação. No entanto, embora os estudos sejam escassos, existem indícios

de que a combinação entre altas pressões e pH na gama básica diminui a inativação (Ritzet *et al.*, 2000). O íon Na^+ , adicionado ao meio em que as células são suspensas quando o pH é ajustado com NaOH, interfere no transporte específico de Na^+ pela membrana e está envolvido na homeostase do pH (San Martín *et al.*, 2002). Embora as soluções de NaOH possam apresentar efeito anti-microbiano, nomeadamente, por desnaturação proteica e saponificação de ácidos gordos, (Vasseur *et al.*, 1999) a sua utilização para elevação do pH pode ter provido a amostra com íões de sódio e exercido um efeito estabilizador sobre a membrana.

Quando as células microbianas são cultivadas em condições alcalinas, os fosfolípidos das membranas apresentam proporção superior de ácidos gordos ramificados, bem como de formas anteiso mais elevada (Giotis *et al.*, 2007). Estas alterações proporcionam maior fluidez na membrana e aumento da tolerância a stresse, nomeadamente, à pressão, tal como discutido anteriormente para os efeitos da temperatura. A maior resistência de *Listeria* a HPP em meio alcalino não é, no entanto, uma limitação relevante em termos de segurança alimentar, uma vez que o pH normal dos alimentos se situa na gama ácida e são muito raros os alimentos com pH neutro ou ligeiramente acima de 7.

O aumento de acidez, em amostras expostas a pressurização, apresenta boas perspectivas de aumentar a inativação bacteriana (Alpas *et al.*, 2000; Daryaei *et al.*, 2010; Alzamora *et al.*, 2012). A inativação de *Listeria monocytogenes* Scott A e CA, em PBS com pH 4, foi 2,5 Log acima da inativação obtida para gamas de pH com alcalinidade entre 0,6 - 2 pontos mais elevada para idênticas condições de pressurização (Stewart *et al.*, 1997). Mais recentemente, foram documentados, para amostras de *Listeria monocytogenes* ATCC19117 em água peptonada tamponizada (0,1% a 5%) submetidas a 300 MPa por 10 minutos a 25 °C, 8 Log adicionais de inativação em pH 4 comparativamente com pH 7 (Koseki e Yamamoto, 2006). No presente estudo, a inativação a pH neutro e ácido não foi significativamente diferente, o que pode estar relacionado com o facto de ter sido usado ácido clorídrico (HCl) na acidificação das amostras. Estudos análogos, em que a acidificação das amostras foi feita com diferentes ácidos, revelaram que os ácidos orgânicos, nomeadamente, ácido acético e ácido láctico têm maior efeito inibitório do que o ácido clorídrico (Vasseur *et al.*, 1999). Os ácidos orgânicos são frequentemente adicionados a alimentos para reduzir a atividade microbiana e

aumentar a sua estabilidade (Beales, 2004). Estes, apresentam maior capacidade de penetração nas membranas celulares do que os inorgânicos (Phan-Thanh *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2009), através de porinas e permeases, e a sua dissociação no ambiente intracelular causa desequilíbrio homeostático e inativação enzimática (Lehrke *et al.*, 2011). Pelo contrário, a membrana citoplasmática apresenta baixa permeabilidade protónica. A entrada de prótons pode ser feita através de transporte transmembranar, mas à custa de consumo de energia e por isso os ácidos inorgânicos fortes que apresentam uma forte capacidade dissociativa no meio extracelular, como é o caso do ácido clorídrico, podem causar efeitos intracelulares menos drásticos (Lehrke *et al.*, 2011).

Os ácidos orgânicos apresentam elevadas taxas de dissociação sob pressão (Rendueles *et al.*, 2011), o que faz com que a comparação de resultados obtidos em experiências de pressurização com manipulação do pH tenham que ser interpretados com cuidado. O tempo que medeia a acidificação e a pressurização pode influenciar a dissociação dos ácidos fora e dentro das células com consequências no resultado final da inativação.

A exposição de células de *Listeria* a stresse ácido ou alcalino induz respostas adaptativas. Estudos com *Listeria monocytogenes* LO28, uma estirpe tolerante à acidez, demonstraram que enquanto as células em fase exponencial necessitam de contacto prévio com condições de acidez subletais para se tornarem tolerantes, as células em fase estacionária são naturalmente mais resistentes (O'Driscoll *et al.*, 1996).

No presente estudo, não foi feita a avaliação da combinação baixa temperatura - baixo pH na suscetibilidade de *L. innocua* à alta pressão. No entanto, este estudo pode ser interessante uma vez que a adaptação à acidez confere proteção cruzada, isto é, proteção contra outros fatores inibitórios, designadamente, choque térmico e choque osmótico (Gahan *et al.*, 1996; Gandhi e Chikindas, 2007). Por outro lado, as baixas temperaturas parecem reduzir a capacidade celular de adaptação a condições de acidez, talvez porque nestas condições a adaptação envolve um processo inverso ao despoletado pela alcalinidade, ou seja, diminuição de fluidez da membrana (Koutsoumanis *et al.*, 2003; Mastronicolis *et al.*, 2010). É também importante considerar que estirpes de *Listeria monocytogenes*, adaptadas a pH baixo, parecem ter uma virulência reforçada (Cotter *et al.*, 2000), o que torna a interação frio-acidez particularmente relevante na utilização da tecnologia de HPP a alimentos, na perspetiva da redução do risco de listeriose.

Conclusões

Os resultados confirmam a suscetibilidade de *Listeria innocua* NCTC 10528 à alta pressão e põem em evidência a interação entre pressão e frio ou acidez, na eficiência do tratamento. O estudo da combinação entre alta pressão e temperatura revela que a pressurização a temperaturas situadas entre a temperatura de congelação e a temperatura ambiente pode ser particularmente eficiente na inativação de *Listeria* em alimentos refrigerados. Embora o pH alto tenha causado uma redução da eficiência de inativação relativamente à obtida com pressurização em ambiente ácido ou neutro, o tratamento de alimentos por HPP para inativação de *Listeria* continua a apresentar-se como promissor, uma vez que os alimentos-veículo típicos apresentam valores de pH na gama ácida.

A aplicação do conceito de tecnologia de barreiras na utilização de coadjuvantes químicos ou físicos em tratamentos por HPP abre portas para a diminuição de custos associados à pressurização e reduzir, a níveis muito baixos, as alterações indesejáveis nas propriedades organoléticas dos alimentos.

Perspetivas futuras

A combinação com vários agentes, na tecnologia de HPP, na perspectiva da segurança alimentar, bem como a caracterização detalhada de efeitos e interações são de extrema importância. O estudo consistente das matrizes e influência dos seus constituintes, em efeitos de baroproteção, é também muito relevante para o estabelecimento de condições de tratamento adequado a cada tipo de alimento e microrganismos mais incidentes neles. É também relevante o estudo dos mecanismos de proteção cruzada e desenvolvimento de resistência após exposições sub-letais repetidas.

A recuperação de microrganismos após pressurização e/ou durante período de armazenamento constitui outra linha de investigação emergente. No caso singular do presente estudo, e numa perspectiva de continuidade, seria interessante verificar a combinação entre alta pressão e outros agentes de preservação ou aditivos alimentares, designadamente, biosurfactantes, moléculas de origem lipídica utilizadas como antimicrobianos na indústria alimentar, e bacteriocinas.

A caracterização dos efeitos biológicos da alta pressão constitui um dos pilares do desenvolvimento e crescente expansão desta técnica. Dado que *Listeria* é um organismo bem adaptado a condições ambientais adversas e por isso um modelo biológico interessante no estudo de respostas ao stresse, a caracterização de respostas adaptativas à alta-pressão neste organismo pode proporcionar um avanço em termos de conhecimento na área da fisiologia e genética bacteriana.

Referências Bibliográficas

- Abe F. 2007. Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: perspectives from piezophysiology. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **71**: 2347-2357.
- Acheson D. 2000. Foodborne Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*. **31**: 770–5.
- Adams M. R. e Moss. M. O. 2008. Food Microbiology. *The Royal Society of Chemistry*. 3ª edição. Cambridge. 463 pp. ISBN: 978-0-85404-284-5.
- Aertsen A., Van Houdt R. Vanoirbeek K. e Michiels C. W. 2004. An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **186**: 6133–6141.
- Aertsen A. e Michiels C. W. 2005. Mrr instigates the SOS response after high pressure stress in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. **58**: 1381–1391.
- Aertsen A., Meersman F., Hendrickx M E. G., Vogel R. F. e Michiels C. W. 2009. Biotechnology under high pressure: applications and implications. *Trends in Biotechnology*. **27**:434-441.
- Allerberger F. 2007. *Listeria*. In: Foodborne Disease (Infectious disease). Simjee S. (Ed.) *Humana Press*, 1ª edição. Nova Jérĩa. 555 pp. ISBN: 978-1-59745-501-5.
- Almeida G. N., Gibbs P. A., Hogg T. A. e Teixeira P. C. 2006. Listeriosis in Portugal: an existing but under reported infection. *BMC Infectious Diseases*. **6**: 1-4.
- Alpas H., Kalchayanand N., Bozoglu F., Sikes A., Dunne C. P. e Ray B. 1999. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**: 4248-4251.
- Alpas H., Kalchayanand N., Bozoglu F. e Ray B. 2000. Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. **60**: 33–42.
- Alzamora S. M., Welti-Chanes J., Guerrero S. N. e Gómez P. L. 2012. Rational use of novel technologies: a comparative analysis of the performance of several new food preservation technologies for microbial inactivation. In: Novel Technologies in food science, integrating food science and engineering knowledge into the food chain. McElhatton A. e Sobral P. J. A. (Ed.). *Springer*. 1ª edição. Londres. 421 pp. ISBN: 978-1-4419-7880-6.

Amina M., Panagou E. Z., Kodogiannis Kodogiannis. S. e Nychas G.-J. E. 2010. Wavelet neural networks for modelling high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* in UHT whole milk. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **103**: 170–183.

Annous B. A., Becker L. A., Bayles D. O., Labeda D. P. e Wilkinson B. J. 1997. Critical role of anteiso-C_{15:0} fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 3887-3894.

Ardia A. 2004. Process considerations on the application of high pressure treatment at elevated temperature levels for food preservation. *Tese de doutoramento*. Universidade Técnica de Berlim. 95 pp.

Arqués J. L., Rodríguez E., Gaya P., Medina M. e Nuñez M. 2005. Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *International Dairy Journal*. **15**: 893–900.

Arroyo G., Sanz P. D. e Préstamo G. 1999. Response to high-pressure, low-temperature treatment in vegetables: determination of survival rates of microbial populations using flow cytometry and detection of peroxidase activity using confocal microscopy. *Journal of Applied Microbiology*. **86**: 544–556.

Atkins P. 2001. The elements of physical chemistry. *Oxford University Press*. 3ª edição. Nova Iorque. 548 pp. ISBN: 0-19-879290-5.

Atkins P. e Jones L. 2005. Chemical principles: the quest for insight. *W. H. Freeman and Company*. 3ª edição. Nova Iorque. 735 pp. ISBN: 0-7167-5701-X.

Atkins P. e Paula J. 2006. Atkins' physical chemistry. *Oxford University Press*. 8ª edição. Nova Iorque. 1064 pp. ISBN:0-19-870072-5.

Balasubramanian S. e Balasubramanian V. M. 2003. Compression heating influence of pressure transmitting fluids on bacteria inactivation during high pressure processing. *Food Research International*. **36**: 661–668.

Balasubramaniam V. M., Ting E. Y., Stewart C. M. e Robbins J. A. 2004. Recommended laboratory practices for conducting high-pressure microbial inactivation experiments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **5**: 299–306.

Balny C. 2004. Pressure effects on weak interactions on biological systems. *Journal of Physics: Condensed Matter*. **16**: S1245-S1253.

- Bartlett D. H. 2002. Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1595**: 367-381.
- Beales N. 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperature, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **3**: 1-20.
- Bermúdez-Aguirre D., Corradini M. G., Mawson R. e Barbosa-Cánovas G. V. 2009. Modeling the inactivation of *Listeria innocua* in raw whole milk treated under thermo-sonication. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **10**: 172-178.
- Bertsch D., Rau J., Eugster M. R., Haug M. C., Lawson P. A., Lacroix C. e Meile L. 2013. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **63**: 526-532.
- Bevilacqua A., Campaniello D. e Sinigaglia M. 2010. Use of high pressure for food preservation. In: Application of alternative food preservation technologies to enhance food safety and stability. Bevilacqua A., Corbo M., e Sinigaglia M. (Ed). *Bentham Science Publishers*. 1ª edição. Potenza. 207 pp. ISBN: 978-1-60805-096-3.
- Bhunia A. K. 2008. Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. *Springer*. Nova Iorque. 249 pp. ISBN: 978-0-387-74537-4.
- Black E. P., Kelly A. L. e Fitzgerald G. F. 2005. The combined effect of high pressure and nisin on inactivation of microorganisms in milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **6**: 286 – 292.
- Black E. P., Setlow P., Hocking A. D., Stewart C. M., Kelly A. L. e Hoover D. G. 2007a. Response of spores to high-pressure processing. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. **6**: 103-119.
- Black E. P., Huppertz T., Fitzgerald G. F. and Kelly A. L. 2007b. Baroprotection of vegetative bacteria by milk constituents: A study of *Listeria innocua*. *International Dairy Journal*. **17**: 104-110.
- Black E. P., Stewart C. M. e Hoover D. G. 2011. Microbial aspects of high-pressure food processing. In: Nonthermal Processing Technologies for Food. Zhang H. Q., Barbosa-Cánovas G. V., Balasubramaniam V. M., Dunne C. P., Farkas D. F. e Yuan J. T. C. (Ed). *Wiley-Blackwell Publishing*. Nova Deli. 1ª edição. 672 pp. ISBN: 978-0-8138-1668-5.
- Bowman J. P., Bittencourt C. R. e Ross T. 2008. Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology*. **154**: 462–475.

- Bull M. K., Hayman M.M., Stewart C. M., Szabo E. A. e Knabel S. J. 2005. Effect of prior growth temperature, type of enrichment medium, and temperature and time of storage on recovery of *Listeria monocytogenes* following high pressure processing of milk. *International Journal of Food Microbiology*. **101**: 53–61.
- Buzrul S. e Alpas H. 2004. Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study. *FEMS Microbiology Letters*. **238**: 29–36.
- Buzrul S., Alpas H., Largeteau A. and Demazeau G. 2008. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in kiwifruit and pineapple juices by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*. **124**: 275–278.
- Carlez A., Rosec J. P., Richard N. e Cheftel J. C. 1993. High pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle. *LWT - Food Science and Technology*. **26**: 357-363.
- Casadei M. A., Mañas P., Niven G., Needs E. e Mackey B. M. 2002. Role of membrane fluidity in pressure resistance of *Escherichia coli* NCTC 8164. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**: 5965-5972.
- Chapleau N., Ritz M., Delépine S., Jugiau F., Federighi M. e Lamballerie M. 2006. Influence of kinetic parameters of high pressure processing on bacterial inactivation in a buffer system. *International Journal of Food Microbiology*. **106**: 324 – 330.
- Cheftel J. C., Lévy J. e Dumay E. 2000. Pressure-assisted freezing and thawing: principles and potential applications. *Food Reviews International*. **16**: 453–483.
- Cheftel J. C. Thiebaud M. e Dumay E. 2002. Pressure-assisted freezing and thawing of foods: a review of recent studies. *High Pressure Research*. **22**: 601–611.
- Chen H. 2007. Temperature-assisted pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* in turkey breast meat. *International Journal of Food Microbiology*. **117**: 55-60.
- Chen H. e Hoover D. G. 2003. Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **4**: 25-34.
- Chung H-J. e Yousef A. E. 2010. Synergistic effect of high pressure processing and *Lactobacillus casei* antimicrobial activity against pressure resistant *Listeria monocytogenes*. *New Biotechnology*. **27**: 403-408.

Cléry-Barraud C., Gaubert A., Masson P. e Vidal D. 2004. Combined effects of high hydrostatic pressure and temperature for inactivation of *Bacillus anthracis* spores. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**: 635-637.

Cleveland J., Montville T. J., Nes I. F. e Chikindas M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. **71**: 1-20.

Codex Committee on Food Hygiene (CCFH). 1999. Discussion paper on management of *Listeria monocytogenes* in foods. Paper presented at Thirty-second Session, Washington DC, 29 November – 4 December 1999. Document no, CX/FH 99/10. FAO/WHO Rome. 15pp.

Collins M. D., Wallbanks S., Lane D. J., Shah J., Nietupski R., Smida J., Dorsch M. e Stackebrand E. 1991. Phylogenetic analyses of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **41**: 240-246.

Considine K. M., Kelly A. L., Fitzgerald G. F., Hill C. e Sleator R. D. 2008. High-pressure processing- effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiology Letters*. **281**:1-9.

Cotter P. D., Gahan C. G. M. e Hill C. 2000. Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* F₀ F₁ - ATPase operon in the acid tolerance response. *International Journal of Food Microbiology*. **60**: 137–146.

Daniel I., Oger P. e Winter R. 2006. Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions. *Chemical Society Reviews*. **35**: 858-875.

Daryaei H., Coventry J., Versteeg C. e Sherkat F. 2010. Combined pH and high hydrostatic pressure effects on *Lactococcus* starter cultures and *Candida* spoilage yeasts in a fermented milk test system during cold storage. *Food Microbiology*. **27**: 1051-1056.

Deguelte S., Metge M.-P. Quereux C. e Gabriel R. 2004. Listériose au cours de la grossesse. *EMC-Gynécologie Obstétrique*. **1**: 180–186.

Demazeau G. 2009. Un siècle de Hautes Pressions: Développements technologiques et scientifiques. *Comptes Rendus Chimie*. **12**: 933-942.

Demazeau G. e Rivalain N. 2011a. High hydrostatic pressure and biology: a brief history. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **89**: 1305–1314.

Demazeau G. e Rivalain N. 2011b. The development of high hydrostatic pressure processes as an alternative to other pathogen reduction methods. *Journal of Applied Microbiology*. **110**: 1359–1369.

- Denys S., Van Loey A. M. e Hendrickx M. E. 2000. A modeling approach for evaluating process uniformity during batch high hydrostatic pressure processing: combination of a numerical heat transfer model and enzyme inactivation kinetics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. **1**:5-19.
- Devlieghere F., Vermeiren L. e Debevere J. 2004. New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*. **14**: 273–285.
- Drider D., Fimland G., Héchard Y., McMullen L. M. e Prévost H. 2006. The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **70**: 564-582.
- Dussurget O., Cabanes D., Dehoux P., Lecuit M., The European *Listeria* Genome Consortium., Buchrieser C., Glaser P. e Cossart P. 2002. *Molecular Microbiology*. **45**: 1095–1106.
- Edgcomb M. R., Sirimanne S., Wilkinson B. J., Drouin P. e Morse R. 2000. Electron paramagnetic resonance studies of the membrane fluidity of the foodborne pathogenic psychrotroph *Listeria monocytogenes*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1463**: 31-42.
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K. e Ishizaki A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*. **24**: 85-106.
- European Centre for Disease Prevention and Control. 2011. *Annual Epidemiological Report 2011*. Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC.
- Erkmen O. 2000. Inactivation of *Salmonella typhimurium* by high pressure carbon dioxide. *Food Microbiology*. **17**: 225-232.
- Erkmen O. 2001. Kinetic analysis of *Listeria monocytogenes* inactivation by high pressure carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*. **47**: 7-10.
- Erkmen O. e Karaman H. 2001. Kinetic studies on the high pressure carbon dioxide inactivation of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Engineering*. **50**: 25-28.
- Escriu R. e Mor-Mur M. 2009. Role of quantity and quality of fat in meat models inoculated with *Listeria innocua* or *Salmonella Typhimurium* treated by high pressure and refrigerated stored. *Food Microbiology*. **26**: 834–840.
- Fernández P. P., Sanz P. D., Molina-García A. D., Otero L., Guignon B. e Vaudagna S. R. 2007. Conventional freezing plus high pressure–low temperature treatment: Physical properties, microbial quality and storage stability of beef meat. *Meat Science*. **77**: 616–625.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1996. Rome declaration on world food security and world food summit plan of action. *World Food Summit 13-17November*. Roma. 43pp.

Gahan C. G. M., O'Driscoll B. e Hill C. 1996. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**: 3128-3132.

Gandhi M. e Chikindas M. L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*. **113**: 1–15.

Gervilla R., Ferragut V. e Guamis B. 2000. High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. *Journal of Dairy Science*. **83**: 674-682.

Giotis E. S., McDowell D. A., Blair I. S. e Wilkinson B. J. 2007. Role of branched-chain fatty acids in pH stress tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**: 997-1001.

Glaser P., Frangeul L., Buchrieser C., Rusniok C., Amend A., Baquero F., Berche P., Bloecker H., Brandt P., Chakraborty T., Charbit A., Chetouani F., Couvé E., Daruvar A., Dehoux P., Domann E., Domínguez-Bernal G., Duchaud E., Durant L., Dussurget O., Entian K.-D., Fsihi H., Garcia-Del Portillo F., Garrido P., Gautier L., Goebel W., Gómez-López N., Hain T., Hauf J., Jackson D., Jones L.-M., Kaerst U., Kreft J., Kuhn M., Kunst F., Kurapkat G., Madueño E., Maitournam A., Mata Vicente J., Ng E., Nedjari H., Nordsiek G., Novella S., de Pablos B., Pérez-Díaz J.-C., Purcell R., Remmel B., Rose M., Schlueter T., Simoes N., Tierrez A., Vázquez-Boland J.A. Voss H., Wehland J. e Cossart P. 2001. Comparative Genomics of *Listeria* Species. *Science*. **249**: 849-852.

Gould G. W. 1996. Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology*. **33**: 51-64.

Graves L. M., Helsel L. O., Steigerwalt A. G., Morey R. E., Daneshvar M. I., Roof S. E., Orsi R. H., Fortes E. D., Milillo S. R., Bakker H. C., Wiedmann M., Swaminathan B. e Sauders B. D. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **60**: 1280–1288.

Guillet C., Join-Lambert O., Le Monnier A., Leclercq A., Mechaï F., Mamzer-Bruneel M., Bielecka K., Scortti M., Disson O., Berche P., Vázquez-Boland J., Lortholary O. e Lecuit M. 2010. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*. **16**: 136-138.

Hain T., Steinweg C. e Chakraborty T. 2006. Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. *Journal of Biotechnology*. **126**: 37-51.

Hain T., Chatterjee S. S., Ghai R., Kuenne C. T., Billion A., Steinweg C., Domann E., Käst U., Jänsch L., Wehland J., Eisenreich W., Bacher A., Joseph B., Schär J., Kreft J., Klumpp J., Loessner M.J., Dorscht J., Neuhaus K., Fuchs T. M., Scherer S., Doumith M., Jacquet C., Martin P., Cossart P., Rusniok C., Glaser P., Buchrieser C., Goebel W. e Chakraborty T. 2007. Pathogenomics of *Listeria* spp. *International Journal of Medical Microbiology*. **297**: 541-557.

Halter E. L., Neuhaus K. e Scherer. 2013. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **63**: 641-647.

Hartmann C., Mathmann K. e Delgado A. 2006. Mechanical stresses in cellular structures under high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **7**: 1 – 12.

Hartmann H. A., Wilke T. e Erdmann R. 2011. Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*. **146**: 192–199.

Hazel J. R. 1995. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annual Review of Physiology*. **57**: 19-42.

He H., Adams R. M., Farkas D. F. e Morrissey M. T. 2002. Use of high hydrostatic pressure for oyster shucking and shelf-life extension. *Food Engineering and Physical Properties*. **67**: 640-645.

Hierro E., Barroso E., Hoz L., Ordóñez J. A., Manzano S. e Fernández M. 2011. Efficacy of pulsed light for shelf-life extension and inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat cooked meat products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **12**: 275-281.

Heinz V. e Buckow R. 2010. Food preservation by high pressure. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. **5**:73–81.

Hereu A., Dalgaard P., Garriga M., Aymerich T. e Bover-Cid S. 2012. Modeling the high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **16**: 305-315.

Hite B. H. 1899. The Effect of Pressure in the Preservation of Milk. *Bulletins West Virginia University Agricultural Experiment Station*. **58**: 15–35.

Hogan E., Kelly A. L. e Sun D-W. 2005. High pressure processing foods: an overview. In: Emerging Technology for food processing. Sun D-W (Ed.). *Academic Press*. 1ª edição. Itália. ISBN: 0-12-676757-2.

Holf H. 1996. Miscellaneous Pathogenic Bacteria. *In: Medical Microbiology*. Baron S.(Ed.) *University of Texas Medical Branch at Galveston*, 4ª edição. Galveston, Texas. 1273 pp. ISBN-10: 0-9631172-1-1.

Iturriaga L., Olabarrieta I. e Marañón I. M. 2012. Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. *International Journal of Food Microbiology*. 158: 58–64.

Jay J. M., Loessner M. J. e Golden A. D. 2005. Modern Food Microbiology. *Springer*. 7ª edição. Nova Iorque. 810 pp. ISBN: 0-387-234136.

Kadam P. S., Jadhav B. A., Salve R. V. e Machewad G. M. 2012. Review on the High Pressure Technology (HPT) for food preservation. *Food Processing and Technology*. **3**: 1-5.

Kalchayanand N., Dunne P., Sikes A. e Ray B. 2004. Viability loss and morphology change of foodborne pathogens following exposure to hydrostatic pressures in the presence and absence of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*. **91**: 91– 98.

Kaletunç G., Lee J., Alpas H. e Bozoglu F. 2004. Evaluation of structural changes induced by high hydrostatic pressure in *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**: 1116-1122.

Kalichevskiy M. T., Knorr D. e Lillford. P. J. 1995. Potential food applications of high-pressure effects on ice-water transitions. *Trends in Food Science & Technology*. **6**: 253-259.

Kass P. H. e Riemann H. P. 2006. Epidemiology of foodborne diseases. *In: FoodBorne Infections and Intoxications*. Riemann H. P. e Cliver D. O. (Ed.) *Academic Press*. 3ª edição. California. 920 pp. ISBN-10: 012588365X.

Keenan D. F., Röble C., Gormley R., Butler F. e Brunton N. P. 2012. Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies. *LWT - Food Science and Technology*. **45**: 50-57.

Khelef N., Lecuit M., Buchrieser C., Cabanes D., Dussurget O. e Cossart P. 2006. *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. *In: The prokaryotes: vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. and Stackebrandt E. (Ed.). *Springer*. Singapura. 1140 pp. ISBN: 0-387-30744-3.

- Knapp K. M. 2006. *Listeria monocytogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, and other Bacteria. In: Congenital and perinatal infections: a concise guide to diagnosis. Hutto C. (Ed.). *Humana Press*. Nova Jérĩa. 328 pp. ISBN: 978-1-59259-965-3.
- Knorr D. 1995. Hydrostatic pressure treatment of food: Microbiology. In: New methods of food preservation. Gould W. G. (Ed.). *Aspen Publishers*. 1ª edição. Maryland. 333 pp. ISBN: 0-8342-1341-9.
- Knorr D., Froehling A., Jaeger H., Reineke K., Schlueter O. e Schoessler K. 2011. Emerging technologies in food processing. *Annual Review of Food Science and Technology*. **2**: 203–35.
- Koutsoumanis K. P., Kendall P. A. e Sofos J. N. 2003. Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 7514-7516.
- Kovac K., Diez-Valcarce M., Hernandez M., Raspor P. e Rodríguez-Lázaro P. 2010. High hydrostatic pressure as emergent technology for the elimination of foodborne viroses. *Trends in Food Science & Technology*. **21**: 558-568.
- Kuntzer T., Radziwill A.-J., Maeder P.-P., Bogousslavsky J. e Bille J. 2004. Listériose et neurolistériose. *EMC-Neurologie*. **1**: 65–74.
- Koseki S. e Yamamoto K. 2006. pH and solute concentration of suspension media affect the outcome of high hydrostatic pressure treatment of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. **111**: 175–179.
- Krebbers B., Matser A. M., Hoogerwerf S. W., Moezelaar R., Tomassen M. M. M. e Berg R. W. 2003. Combined high-pressure and thermal treatments for processing of tomato puree: evaluation of microbial inactivation and quality parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. **4**: 377-385.
- Lado B. H. e Yousef A. E. 2002. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*. **4**: 433–440.
- Lakshmanan R., Piggott J. R. e Paterson A. 2003. Potential applications of high pressure for improvement in salmon quality. *Trends in Food Science & Technology*. **14**: 354–363.
- Lambert Y., Demazeau G., Largeau A., Bouvier J. M., Laborde-Croubit S. e Cabannes M. 2000. Packaging for high-pressure treatments in the food industry. *Packaging Technology and Science*. **13**: 63-71.
- Le Monnier A. e Leclercq A. 2009. *Listeria* et listériose: des animaux d'élevage à nos assiettes *Listeria* and listeriosis: From farm to fork. *Pathologie Biologie*. **57**: 17–22.

Leclercq A., Clermont D., Bizet C., Grimont P. A. D., Le Flèche-Matéos A., Roche S. M., Buchrieser C., Cadet-Daniel V., Le Monnier A., Lecuit M. e Allerberger F. 2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **60**: 2210–2214.

Lecuit M. 2007. Human listeriosis and animal models. *Microbes and Infection*. **9**: 1216-1225.

Lee S-Y., Dougherty R. H. e Kang D-H. 2002. Inhibitory effects of high pressure and heat on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**: 4158-4161.

Lehrke G., Hernaez L., Mugliaroli S. L., Staszewski M. V. e Jagus R. J. 2011. Sensitization of *Listeria innocua* to inorganic and organic acids by natural antimicrobials. *LWT - Food Science and Technology*. **44**: 984-991.

Leistner L. e Gorris L. G. M. 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*. **6**: 41-46.

Leistner L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*. **55**: 181-186.

Levine I. N. 1995. Physical Chemistry. *McGraw-Hill*. 4ª edição. Singapura. 901 pp. ISBN:0-07-112472-7.

Ludwig H. 2002. Cell biology and high pressure: applications and risks. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1595**: 390-391.

Luscher C., Balasa A., Fröhling A., Ananta E. e Knorr D. 2004. Effect of high-pressure-induced ice I-to-ice III phase transitions on inactivation of *Listeria innocua* in frozen suspension. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**: 4021–4029.

Mackey B. M., Forestière K. e Isaacs N. 1995. Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology*. **9**: 1-11.

Mañas P. e Pagán R. 2005. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*. **98**: 1387–1399.

Masschalck B., Van Houdt R. e Michiels C. W. 2001. High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *International Journal of Food Microbiology*. **64**: 325–332.

- Mastronicolis S. K., Berberi A., Diakogiannis I., Petrova E., Kiaki I., Baltzi T. e Xenikakis P. 2010. Alteration of the phospho- or neutral lipid content and fatty acid composition in *Listeria monocytogenes* due to acid adaptation mechanisms for hydrochloric, acetic and lactic acids at pH 5.5 or benzoic acid at neutral pH. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **98**: 307-316.
- Mathys A., Reineke K., Heinz V. e Knorr D. 2009. High pressure thermal sterilization – development and application of temperature controlled spore inactivation studies. *High Pressure Research*. **29**: 3–7.
- Matser A. M., Krebbers B., Berg W. R. e Bartels P. V. 2004. Advantages of high pressure sterilisation on quality of food products. *Trends in Food Science & Technology*. **15**: 79–85.
- McLauchun J. e Rees C. E. D. 2009. Genus I. *Listeria* Pirie 1940a, 383^{AL}. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 3: The Firmicutes. De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K-H. e Whitman W. B. (Ed.). Springer. 2ª edição. Londres. 1450 pp. ISBN: 978-0-387-68489-5.
- Miller F. A., Brandão T. R. S., Teixeira P. e Silva C. L. M. 2006. Recovery of heat-injured *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology*. **112**: 261–265.
- Miller F. A., Ramos B., Gil M. M., Brandão T. R. S., Teixeira P. e Silva C. L. M. 2009. Influence of pH, type of acid and recovery media on the thermal inactivation of *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology*. **133**: 121–128.
- Miller F. A., Ramos B., Gil M. M., Brandão T. R. S., Teixeira P. e Silva C. L. M. 2011. Heat inactivation of *Listeria innocua* in broth and food products under non-isothermal conditions. *Food Control*. **22**: 20-26.
- Mor-Mur M. e Yuste J. 2005. Microbial aspects of high pressure processing. In: Emerging Technology for food processing. Sun D-W (Ed.). Academic Press. 1ª edição. Itália. ISBN: 0-12-676757-2.
- Mújica-Paz H., Valdez-Fragoso A., Samson C. T., Welte-Chanes J. e Torres J. A. 2011. High-pressure processing for the pasteurization and sterilization of foods. *Food and Bioprocess Technology*. **4**: 969–985.
- Muñoz-Cuevas M., Guevara L., Aznar A., Martínez A., Periago P. M. e Fernández P. S. 2013. Characterization of the resistance and the growth variability of *Listeria monocytogenes* after high hydrostatic pressure treatments. *Food Control*. **29**: 409-415.
- Murchie L. W., Cruz-Romero M., Kerry J. P., Linton M., Patterson M. F., Smiddy M. e Kelly A. L. 2005. High pressure processing of shellfish: a review of microbiological and other quality aspects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **6**: 257 – 270.

Najjar M. B., Chikindas M. e Montville T. J. 2007. Changes in *Listeria monocitogenes* membrane fluidity in response to temperature stress. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**: 6429-6435.

Nguyen L. T. e Balasubramaniam V. M. 2011. Fundamentals of food processing using high hydrostatic pressure. In: Nonthermal Processing Technologies for Food. Zhang H. Q., Barbosa-Cánovas G. V., Balasubramaniam V. M., Dunne C. P., Farkas D. F. e Yuan J. T. C. (Ed.). *Wiley-Blackwell Publishing e Institute of Food Technologists Press*. Nova Deli. 672pp. ISBN: 978-0-8138-1668-5.

Nishiyama M. e Sowa Y. 2012. Microscopic analysis of bacterial motility at high pressure. *Biophysical Journal*. **102**: 1872–1880.

O’Driscoll B., Gahan C. G. M. e Hill C. 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied and Environmental Microbiology*. **5**: 1693-1698.

Oey I., Van der Plancken I., Van Loey A. e Hendrickx M. 2008. Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems? *Trends in Food Science & Technology*. **19**: 300-308.

Oger P. M. e Jebbar M. 2010. The many ways of coping with pressure. *Research in Microbiology*. **161**: 799-809.

Palgan I., Caminiti I. M., Muñoz A., Noci F., Whyte P., Morgan D. J., Cronin D. A. e Lyng J. G. 2011. Effectiveness of High Intensity Light Pulses (HILP) treatments for the control of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice, orange juice and milk. *Food Microbiology*. **28**: 14-20.

Parton T., Bertucco A., Elvassore N. e Grimolizzi L. 2007. A continuous plant for food preservation by high pressure CO₂. *Journal of Food Engineering*. **79**: 1410–1417.

Paschke A. 2009. Aspects of food processing and its effect on allergen structure. *Molecular Nutrition & Food Research*. **53**: 959 – 962.

Patterson M. F. 2005. Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology*. **98**:1400-1409.

Patterson M. e Kilpatrick D. 1998. The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *Journal of Food Protection*. **61**: 432-436.

Phan-Thanh L., Mahouin F. e Aligé S. 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. **55**: 121–126.

- Pereira R. N. e Vicente A. A. 2010. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Research International*. **43**: 1936–1943.
- Perni S., Jordan S. J., Andrew P. W. e Shama G. 2006. Biofilm development by *Listeria innocua* in turbulent flow regimes. *Food Control*. **17**: 875–883.
- Picart L., Dumay E., Guiraud J-P. e Cheftel J. C. 2005. Combined high pressure–sub-zero temperature processing of smoked salmon mince: phase transition phenomena and inactivation of *Listeria innocua*. *Journal of Food Engineering*. **68**: 43–56.
- Pilavtepe-Çelik M., Balaban M. O. Alpas H. e Yousef A. E. 2008. Image analysis based quantification of bacterial volume change with high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*. **73**: M423-M429.
- Posfay-Barbe K. M. e Wald E. R. 2009. Listeriosis. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. **14**: 228–233.
- Rademacher B., Werner F. e Pehl M. 2002. Effect of the pressurizing ramp on the inactivation of *Listeria innocua* considering thermofluidodynamical processes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. **3**: 19-24.
- Raso J. e Barbosa-Cánovas G. V. 2003. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **43**: 265–285.
- Rastogi N. K., Raghavarao K. S. M. S., Niranjana K. e Knorr D. 2002. Recent developments in osmotic dehydration: methods to enhance mass transfer. *Trends in Food Science & Technology*. **13**: 48-59.
- Rastogi N. K., Raghavarao K. S. M. S., Balasubramaniam V. M., Niranjana K. e Knorr D. 2007. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **47**: 69-112.
- Regulamento (CE) N° 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*. L 338/1- L 338/26.
- Rendueles E., Omer M. K., Alvseike O., Alonso-Calleja C., Capita R. e Prieto M. 2011. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT - Food Science and Technology*. **44**: 1251-1260.
- Reyns K. M. F. A., Soontjens C. C. F. , Cornelis K., Weemaes C. A., Hendrickx M. E. e Michiels C. W. 2000. Kinetic analysis and modelling of combined high-pressure– temperature inactivation of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*. **56**: 199–210.

- Ritz M., Jugiau F., Rama F., Courcoux P., Semenou M. e Federighi M. 2000. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure: effects and interactions of treatment variables studied by analysis of variance. *Food microbiology*. **17**: 375-382.
- Ritz M., Tholozan J. L., Federighi M. e Pilet M. F. 2001. Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 2240-2247.
- Ritz M., Tholozan J. L., Federighi M. e Pilet M. F. 2002. Physiological damages of *Listeria monocytogenes* treated by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*. **79**: 47– 53.
- Ritz M., Pilet M. F., Jugiau F., Rama F. e Federighi M. 2006. Inactivation of *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* using high-pressure treatments: destruction or sublethal stress? *Letters in Applied Microbiology*. **42**: 357-362.
- Rivalain N., Roquain J. e Demazeau G. 2010. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. *Biotechnology Advances*. **28**: 659–672.
- Roberts A. J. e Wiedmann M. 2003. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **60**: 904–918.
- Rocourt J., Jacquet C. e Reilly A. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology*. **62**: 197–209.
- Ross A. I. V., Griffiths M. W., Mittal G. S. e Deeth H. C. 2003. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. **89**: 125– 138.
- Russell N. J. 2002. Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. *International Journal of Food Microbiology*. **79**: 27– 34.
- Ryser E. T. e Donnelly C. W. 2002. *Listeria*. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Downes F. P e Ito K. (Ed.) *American Public Health Association*. Washington DC. 687 pp. ISBN: 0-87553-175-x.
- Sallen B. Rajoharison A., Desvarenne S., Quinn F. and Mabilat C. 1996. Comparative analysis of 16 S and 23 rRNA sequences of *Listeria* species. *International Journal os Systematic Bacteriology*. **44**: 669-674.

- Salvador A. C., Saraiva J. A., Fidalgo L. G. e Delgadillo I. 2013. Effect of high pressure on cod (*Gadus morhua*) desalting. *High Pressure Research: An International Journal*. **34**: 1-8.
- San Martín M. F., Barbosa-Cánovas G. V. e Swanson B. G. 2002. Food processing by high pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **42**: 627-645.
- Saucedo-Reyes D., Marco-Celdrán A., Pina-Pérez M. C., Rodrigo D. e Martínez-López A. 2009. Modeling survival of high hydrostatic pressure treated stationary- and exponential-phase *Listeria innocua* cells. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **10**: 135–141.
- Schleining G. 2007. Preventive measures for food safety: hygienic design and cleaning validation. In: Food safety: a practical and case study approach. McElhatton A. e Marshall R. J. (Ed). *Springer*. Nova Iorque. ISBN: 978-0-387-33957-3.
- Schuchat A., Swaminathan B. e Broome C. V. 1991. Epidemiology of Human Listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*. **4**: 169-183.
- Sepulveda D. R., Góngora-Nieto M. M., San Martín M. F. e Barbosa Cánovas G. V. 2005. Influence of treatment temperature on the inactivation of *Listeria innocua* by pulsed electric fields. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. **38**: 167–172.
- Shen T., Benet G. U., Brul S. e Knorr D. 2005. Influence of high-pressure–low-temperature treatment on the inactivation of *Bacillus subtilis* cells. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **6**: 271 – 278.
- Simonato F., Campanaro S., Lauro F. M., Vezzi A., D’Angelo M., Vitulo N., Valle G. e Bartlett D. H. 2006. Piezophilic adaptation: a genomic point of view. *Journal of Biotechnology*. **126**: 11–25.
- Slaghuis J., Joseph B. e Goebel W. 2007. Metabolism and Physiology of *Listeria Monocytogenes*. In: *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and Host Response*. Howard G.e Shen H. (Ed.). *Springer*. Nova Iorque. 300 pp. ISBN: 0-387-49373-5.
- Smelt J. P. P. M. 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*. **9**: 152-158.
- Smiddy M., O’Gorman L., Sleator R. D., Kerry J. P., Patterson M. F., Kelly A. L. e Hill C. 2005. Greater high-pressure resistance of bacteria in oysters than in buffer. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **6**: 83– 90.

- Søltoft-Jensen J. e Hansen F. 2005. New chemical and biochemical hurdles. *In: Emerging technology for food processing*. Sun D-W (Ed.). *Academic Press*. 1ª edição. San Diego. ISBN: 0-12-676757-2.
- Stewart C. M., Jewett F. F., Dunne C. P. e Hoover D. G. 1997. Effect of concurrent high hydrostatic pressure, acidity and heat on the injury and destruction of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food and Safety*. **17**: 23-36.
- Swaminathan B. e Gerner-Smidt P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*. **9**: 1236-1243.
- Tholozan J. L., Ritz M., Jugiau F., Federighi M. e Tissier J. P. 2000. Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Applied Microbiology*. **88**: 202–212.
- Todd E. C. D. e Notermans S. 2011. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. **22**: 1484-1490.
- Toepfl S., Mathys A., Heinz V. e Knorr D. 2006. Review: potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing. *Food Reviews International*. **22**: 405–423.
- Torres J. A. e Velazquez G. 2005. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*. **67**: 95–112.
- Vasseur C., Baverel L., Hébraud M. e Labadie J. 1999. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*. **68**: 469-476.
- Vázquez-Boland J. A., Domínguez-Bernal G., González-Zorn B., Kreft J. e Goebel W. 2001. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes and Infection*. **3**: 571-584.
- Vercammen A., Vivijis B., Lurquin I. e Michiels C. W. 2012. Germination and inactivation of *Bacillus coagulans* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high hydrostatic pressure treatment in buffer and tomato sauce. *International Journal of Food Microbiology*. **152**: 162–167.
- Wang L., Pan J., Xie H., Yang Y. e Lin C. 2010. Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by the synergistic action of high hydrostatic pressure and dissolved CO₂. *International Journal of Food Microbiology*. **144**: 118–125.

- Warriner e Namvar. 2009. What is the hysteria with *Listeria*? *Trends in Food Science & Technology*. **20**: 245-254.
- Winter R. e Dzwolak W. 2005. Exploring the temperature-pressure configurational landscape of biomolecules: from lipid membrane to proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*. **365**: 537-563.
- Winter R. e Jeworrek C. 2009. Effect of pressure on membranes. *Soft Matter*. **5**: 3157–3173.
- Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P., Procop G. e Woods G. 2006. Koneman's: Color atlas and textbook of diagnostic in microbiology. *Lippincott Williams & Wilkins*. 6ª edição. Filadélfia. 1736 pp. ISBN: 9780781730143.
- Wuytack E. Y. e Michiels C. W. 2001. A study on the effects of high pressure and heat on *Bacillus subtilis* spores at low pH. *International Journal of Food Microbiology*. **64**: 333–341.
- Wuytack E. Y., Diels A. M. J. e Michiels C. W. 2002. Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*. **77**: 205– 212.
- Ye M., Huang Y. e Chen H. 2012. Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in oysters by high-hydrostatic pressure and mild heat. *Food Microbiology*. **32**: 179-184.
- Yousef A. E. e Carlstrom C. 2003. Food Microbiology: A Laboratory Manual. *Jonh Wiley and Sons*. Nova Jérσία. 288 pp. ISBN: 0-471-39105-0.
- Yuste J., Mor-Mur M., Capellas M. e Pla R. 1999. *Listeria innocua* and aerobic mesophiles during chill storage of inoculated mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure. *Meat Science*. **53**: 251-257.
- Yuste J., Capellas M., Pla R., Fung D. Y. C. e Mor-Mur M. 2001. High pressure processing for food safety and preservation: a review. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*. **9**: 1-10.
- Yuste J., Pla R., Capellas M. e Mor-Mur M. 2002. Application of high-pressure processing and nisin to mechanically recovered poultry meat for microbial decontamination. *Food Control*. **13**: 451–455.
- Zeece M., Huppertz T. e Kelly A. 2008. Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of β -lactoglobulin. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **9**: 62-69.

Anexos

Effect of temperature and compression/decompression rates on high-pressure inactivation of *Listeria*

Journal:	<i>Applied Microbiology</i>
Manuscript ID:	Draft
Journal Name:	Journal of Applied Microbiology
Manuscript Type:	JAM - Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Ferreira, Marina; University of Aveiro, Biology Department Pereira, Sónia; University of Aveiro, Biology Department Almeida, M. Adelaide; University of Aveiro, Department of Biology and CESAM Queirós, Rui; University of Aveiro, Chemistry Department and QOPNA Delgadillo, Ivonne; University of Aveiro, Chemistry Department and QOPNA Saraiva, Jorge; University of Aveiro, Chemistry Department and QOPNA Cunha, Angela; University of Aveiro, Department of Biology and CESAM
Key Words:	Food preservation, <i>Listeria</i> , Microbial contamination

Effect of temperature and compression/decompression rates on high-pressure
inactivation of *Listeria*

Marina Ferreira^a, Sónia Pereira^a, Adelaide Almeida^b, Rui Queirós^c, Ivonne Delgadillo^c,
Jorge Saraiva^c, Ângela Cunha^{b*}

^aDepartment of Biology, University of Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro,
Portugal

^bDepartment of Biology and CESAM, University of Aveiro, Campus de Santiago, 3810-
193 Aveiro, Portugal

^cDepartment of Chemistry and QOPNA, , University of Aveiro, Campus de Santiago,
3810-193 Aveiro, Portugal

*Corresponding author:

Angela Cunha

Department of Biology, University of Aveiro

Campus de Santiago

3810-193 Aveiro

Portugal

e-mail: acunha@ua.pt

Running title: HIGH-PRESSURE INACTIVATION OF *LISTERIA*

Abstract

Aims: The main objective of the present study was to evaluate the effect of temperature during processing and compression/decompression rates on the efficiency of inactivation of *Listeria* by high-pressure processing (HPP).

Methods and Results: Stationary phase cultures of *Listeria innocua*, used as a surrogate of the pathogenic *Listeria monocytogenes*, were initially subjected to pressure at 4, 10 and 20 °C. The ‘worst-case-scenario’, i.e. the temperature for which bacterial cells presented the lowest susceptibility to pressure (20 °C), was selected to test the effect of different compression and decompression rates.

Differences in the inactivation factor obtained with different compression and decompression rates were only significant in treatments with 300 MPa, during 5 minutes. The inactivation was more efficient at low temperature and with the lowest compression and decompression rates (1.5 MPa s⁻¹ and 3.2 MPa s⁻¹, respectively).

Conclusions: The kinetics of pressure building up and relieve, as well as the temperature under which the treatment is conducted, have a significant impact on the outcome of the inactivation of *Listeria* by HPP. Therefore, these parameters must be carefully controlled when the efficient inactivation of *Listeria* is intended.

Significance and Impact of the Study: The enhanced susceptibility of *L. innocua* to HPP below room temperature may provide the basis for HPP protocols that better preserve food nutritional properties, texture and flavor that may be perishable under high temperature processing.

50 **Keywords**

51 High-pressure processing (HPP), *Listeria*, temperature, compression and decompression
52 rates, food safety.

53

FOR PEER

Introduction

In recent years, many technological advances have been achieved by the food industry in relation to pathogens control. Currently, food preservation methods lead to the inactivation of microorganisms and enzymes and/or inhibition of microbial activity and growth (Raso and Barbosa-Cánovas 2003). Pathogens present in raw materials may be partly or totally eliminated during processing or preparation of food, but there is still a growing demand for processing techniques that can reduce microbial load and increase the food safety level, without compromising the desirable properties of food products.

Given its advantages, high-pressure processing (HPP) has been considered as a promising alternative to conventional thermal pasteurization. Some of the most interesting features of this approach are the occurrence of microbial death without using heat, chemical additives or preservatives, the possibility to process food at ambient or refrigeration temperatures, the preservation of food natural flavor and texture and the technological possibility to create ingredients with novel functional properties (Rastogi *et al.* 2007).

The microorganisms susceptibility to pressure may vary considerably, namely with the cell wall composition and growth phase of vegetative cells. Gram-positive bacteria are more resistant to HPP than Gram-negative bacteria, and stationary phase cells are more resistant than cells in exponential phase of growth (Smelt 1998, Yuste *et al.* 2004).

Temperature and pressurization parameters, such as compression and decompression rates, may significantly influence the process outcome (Ramirez *et al.* 2009). It has been suggested that bacteria vegetative cells have a lower susceptibility to

pressure at temperatures between 20 and 30 °C (Raso and Barbosa-Cánovas 2003). The influence of compression and decompression rates on several microorganisms inactivation in different food matrices has been studied, but contradictory results have been obtained and some controversy persists. A low compression rate is expected to induce a stress response from microbial cells, consequently leading to a less effective inactivation process (Smelt 1998). Enhanced inactivation of vegetative bacterial cells (Noma *et al.* 2002, Chapleau *et al.* 2006) and endospores (Hayakawa *et al.* 1998) with fast compression and/or decompression has been demonstrated but the inverse effect has also been reported. In treatments by a single pressure pulse, the inactivation efficiency was highest with the slowest compression and decompression (Chapleau *et al.* 2006) and some experiments with *Listeria innocua* failed to demonstrate any significant effect of the pressurization ramp on the final outcome of the inactivation (Rademacher *et al.* 2002). It is most likely that the effect of the compression and decompression kinetics is strongly modulated by other physical and chemical factors, namely pressure value and temperature, during the processing.

For these reasons, it is of paramount importance that appropriate HPP protocols are designed taking into account the characteristics of particular food products and target microorganisms, in order to maximize microbial inactivation and efficiently extend shelf life. This work main objective was to assess the importance of temperature and compression and decompression rates as determinant parameters on the efficiency of *Listeria innocua* inactivation by HPP, in order to provide scientific basis to design more efficient inactivation protocols.

In this study, *L. innocua*, a non-pathogenic species, was used as an amenable surrogate for the pathogenic *L. monocytogenes*. *L. innocua* displays responses to chemical or thermal stress, similar to those of *L. monocytogenes* and it occurs in the

same natural environments (Gleeson and O'Beirne 2005, Gallo *et al.* 2007, Miller *et al.* 2009).

Materials and methods

Bacterial cultures

Listeria innocua (10528, National Collection of Type Cultures, UK; NCTC) was obtained from *Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, Porto* (Portugal). The stock cultures were streaked monthly and maintained in Tryptic Soy Agar (TSA, Liofilchem®) at 4 °C. For longer storage, liquid cultures in Tryptic Soy Broth (TSB, Liofilchem®) were cryopreserved at -80 °C with 20% sterile glycerol.

Fresh stationary phase cultures were prepared before each inactivation assays. An isolated colony was inoculated in 50 mL of TSB and incubated for 20 h at 37 °C with continuous agitation at 170 rpm. From this culture, an aliquot of 200 µL of culture was transferred to 200 mL of TSB previously stabilized at 37 °C. This second culture was incubated in the same conditions of the first for approximately 12 h that corresponds to the time required to reach stable stationary phase, as determined by preliminary growth-curve assays (data not shown).

High-Pressure Processing assays

The high-pressure equipment (Unipress Equipment, Model U33, Poland) has a pressure vessel with a maximum capacity of approximately 100 mL (35 mm diameter and 100 mm height). An external jacket is connected to a thermostatic bath for

temperature control. The equipment delivers pressures up to 700 MPa within a temperature range of -20 °C - 100 °C and it allows the analogical manipulation of the compression and decompression rates. Exact values for compression and decompression rates can be calculated for each individual assay.

For high-pressure experiments, the stationary phase culture prepared as described in section 2.1 was maintained in melting ice, and distributed in sterile compression microtubes (Microtube PE 0.5 mL Beckmann). The microtubes were completely filled avoiding air bubbles, and tightly capped. Sets of 3 replicates were wrapped in parafilm (Parafilm®) and put into polyethylene bags that were filled with sterile water, heat sealed, and kept in melting ice until 10 minutes before compression. After compression, the bags were kept in melting ice until processing of the samples for the determination of the viable cells concentration.

In order to set out the most adequate treatment conditions for the subsequent experiments, in which a significant but incomplete inactivation was intended, the relation between microorganism survival and pressure was initially established. Samples were subjected to 100, 200, 300, 400, 500, and 600 MPa, during 5 minutes, at room temperature (22-24 °C). The pressure holding time reported did not include the compression and decompression time. For these initial experiments, the compression and decompression rates were set to a fixed value (medium).

Effect of temperature

To assess the temperature influence during high-pressure treatment on the efficiency of *L. innocua* inactivation, HPP assays were conducted at 4, 10 and 20 °C with a pressure value of 300 MPa, and 5 minute holding time.

Effect of compression and decompression rates

In order to evaluate the influence of compression and decompression rates in the efficiency of *L. innocua* inactivation, bacterial cells were submitted to slow, intermediate, and fast compression and decompression. Two different pressure values, 300 MPa and 400 MPa, were applied for 1 or 5 minutes, at 20 °C. The compression rate was calculated by dividing the holding pressure value by the time required to reach it and the decompression rate was calculated by dividing the holding pressure value by the time (s) required to its complete release. Compression and decompression rates were expresses as MPa s⁻¹.

Microbiological analyses

Initially, OD₆₀₀ of the stationary phase culture was checked and aliquots of 100 µL were taken for the determination of concentration of viable cells in the initial culture, untreated control (N₀). For that, the culture aliquots were serially diluted in Ringer solution (Merck Millipore) and pour-plated in TSA, in triplicate. The plates were incubated for 48 h at 37 °C and colonies were counted in the replicates of the most suitable dilution. The viable cells concentration (CFU mL⁻¹) was determined from the average of the replicates, corrected for the dilution factor. The viable cells concentration in treated samples (N_i) was determined as in untreated cells.

The inactivation factor (IF) was calculated as the logarithmic reduction of the colony forming units concentration using the expression $IF = \log_{10} (N_0/N_i)$.

Replication and statistical analysis

All experimental conditions were tested in 3 replicates and all experiments were repeated as 3 independent assays. The IF for each condition was calculated as the average of the IF values of the independent assays.

Significant differences between treatments were assessed by ANOVA, after verification of normal distribution and homogeneity of variances. Whenever significant differences were detected, the post-hoc bilateral Tukey's test was applied. When normality was not observed, the differences significance was evaluated by the Kruskal-Wallis test. The level of significance was set to 0.05. All statistical analyses were conducted with the SPSS Statistics 20 package.

Results

Relation between inactivation factor and pressure

The inactivation factor (IF) values of *L. innocua* obtained with pressures between 100 MPa and 600 MPa are represented in fig. 1. Between 100 and 400 MPa, there was an increase in the inactivation efficiency with increasing pressure (ANOVA, $P < 0.05$) and the IF varied between 0.3 ± 0.29 with 100 MPa, and 9.2 ± 0.00 with 400 MPa. The highest incomplete inactivation corresponded to a 4.4 ± 0.07 log reduction in the viable cells concentration and was obtained with the 300 MPa treatment. With pressure values ≥ 400 MPa, the bacterial culture was inactivated to the detection limit (complete inactivation, $IF > 9$).

Relation between inactivation factor and temperature

The evaluation of the temperature effect during HPP treatment on the inactivation efficiency shows that, at 300 MPa, susceptibility to pressure decreased with increasing temperature (Fig. 2). Susceptibility was the highest at 4 °C ($IF = 5.6 \pm 0.25$), although not significantly different from that obtained at 10 °C ($IF = 5.1 \pm 0.32$). Significantly lower inactivation ($P < 0.05$) was obtained at 20 °C (3.0 ± 0.46).

Relation between inactivation factor and compression/decompression rates

Three different compression/decompression rates were tested. The exact values used for each experimental condition are presented in table 1.

The IF values calculated for treatments with 300 MPa are represented in fig. 3. The IF obtained with 1 minute holding time varied between 0.4 – 0.5 for all tested compression and decompression rates, and the differences between the results obtained with different compression and decompression rates were not significant (ANOVA, $P > 0.05$). However, with 5 minute holding time, there were statistically significant differences (ANOVA, $P < 0.05$) and the IF was higher with the lowest compression and decompression rates ($IF = 3.2 \pm 0.49$). With higher compression and decompression rates, the *L. innocua* inactivation with 5 minute holding time was significantly less efficient although the differences between the results obtained with intermediate and high compression and decompression rates are not significant. When a pressure of 400 MPa was used, compression and decompression rates did not have a significant effect (ANOVA, $P > 0.05$) on the *L. innocua* inactivation, either with 1 or 5 minute holding time. The maximum IF value obtained was 8.3 ± 1.17 with the highest compression and decompression rates and 5 minute holding time (Fig. 4).

Discussion

HPP is commonly accepted as an effective method for the inactivation of microorganisms, and foods in which this technology is used are increasingly gaining public acceptance (Sousa *et al.* 2013). However, due to the high level risk to human health, some particular microorganisms require an in depth characterization in terms of HPP susceptibility, envisaging the design of efficient and economically sustainable processing protocols. Several studies attempted to characterize the kinetics of the HPP *Listeria* inactivation in different food matrices and it is now well established that, such as for other microorganisms, cells in stationary phase are less susceptible to high-pressure than in exponential phase and the chemical environment can significantly modulate the outcome of HPP for the *Listeria* inactivation (Mackey *et al.* 1995).

In this work, the growth phase was tightly controlled in order to obtain stationary phase cells, therefore displaying the lowest susceptibility level to pressure. Also, the treatments were applied to liquid cultures in standardized culture medium (TSB), keeping a constant chemical environment while experimentally manipulating other factors that may determine the efficiency of HPP *L. innocua* inactivation. In order to detect variations in the inactivation efficiency, as expressed by the calculated IF, conditions that would not cause complete inactivation were selected from preliminary assays.

L. innocua was exposed to different pressure values (100-600 MPa) at room temperature with a constant 5 minute holding time. The results obtained are coherent with the information available in the literature. For a constant 5 minutes holding time,

The inactivation increased directly with the pressure applied between 100 and 400 MPa. A direct relation between pressure and inactivation has been demonstrated for *Listeria* as well as for other types of bacterial cells and endospores (Mackey *et al.* 1995, Yuste *et al.* 1999, Dogan and Erkmen 2004, Margosch *et al.* 2004, Rendueles *et al.* 2011, Yang *et al.* 2012). From the results obtained, 300 MPa pressure was selected to be used in subsequent tests as causing the highest incomplete inactivation. The inactivation factors obtained are also in agreement with values reported for *L. innocua* in other HPP studies (Alpas *et al.* 1998, Buzrul *et al.* 2008, Gudbjornsdottir *et al.* 2010, Evrendilek and Balasubramaniam 2011), even though those values vary considerably with different compression conditions, and matrices in which the microorganism is inoculated and later subjected to pressurization. As an example, for equivalent holding times, the IF can be as small as 1.0-1.5 in smoked salmon treated with 400-500 MPa (Gudbjornsdottir *et al.* 2010) and up to 4.5-5.0 in dairy products treated with 250 to 350 MPa (Evrendilek and Balasubramaniam 2011).

Effect of temperature

The temperature effect on the efficiency of high-pressure inactivation has been studied for a wide range of microorganisms, but more often for temperature ranges above 25 °C. As a general trend, microbial inactivation rate increases when temperature rises above the optimal growth temperature (Hugas *et al.* 2002, Patterson 2005) and microbial cells tend to be less susceptible to pressurization when the process is conducted at temperatures between 20 °C and 30 °C (Alpas *et al.* 2000, Raso and Barbosa-Cánovas 2003). HPP studies below room temperature are still scarce and this information becomes particularly critical when the inactivation of microorganisms able

to grow under refrigeration temperatures, such as *Listeria monocytogenes* (Bajard *et al.* 1996), is intended.

The present work results indicate that the *L. innocua* inactivation in TSB was highest when pressurization was conducted below room temperature (4-10 °C). Similar results have been obtained for *Listeria* species inoculated in meat (Carlez *et al.* 1993, Chen 2007), milk (Gervilla *et al.* 2000) and vegetables (Arroyo *et al.* 1999) and in some cases, the inactivation factor at 4 °C is only exceeded when pressurization temperature is higher than 50 °C (Carlez *et al.* 1993). This enhancing effect of cold in the high-pressure inactivation of microorganisms was also observed in *Lactobacillus helveticus* and *Pseudomonas fluorescens* but it is not a general feature of HPP bacteria inactivation. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* are more susceptible at 25 °C than at lower temperatures (Gervilla *et al.* 2000) which stresses the need for individual testing of target microorganisms.

Effect of the compression and decompression rates

In order to assess if the compression and/or decompression rates have a significant effect in the *L. innocua* inactivation, different compression and decompression rates – low, medium and high – were tested.

IF values calculated for treatments with 300 MPa were not significantly different for 1 minute holding time, but were significantly higher with slow compression and decompression, in relation to medium and fast compression and decompression rates, when holding time was extended to 5 minutes. These are apparently counter intuitive results considering that a prolonged compression period would elicit stress responses and reduce susceptibility (Smelt 1998). A recent study conducted with *Escherichia coli* O157: H7 indicated that inactivation is enhanced with fast compression and with slow

decompression (Syed *et al.* 2013). In the present study, the overall effect combines the damage caused during compression and decompression and the general trend of higher IF values with the slowest compression and decompression may be interpreted as an indication that the inactivation of *L. innocua*, such as proposed for other microorganisms, is more affected by the decompression rate than by the compression rate (Noma *et al.* 2002). However, results on the effect of the pressurization kinetics are still controversial. Experiments with *L. monocytogenes* have produced highest inactivation efficiency with fastest compression and decompression processes (Chapleau *et al.* 2006) but the decompression rates tested (5, 20 and 250 MPa s⁻¹) were much higher than the range used in the present work (1.5 - 23.8 MPa s⁻¹). Difficulties in the results comparison also arise from very different experimental conditions, namely in terms of pressure and temperature, because most studies are conducted in maximum inactivation conditions. The fact that IF calculated for treatments with 400 MPa was not significantly different between different compression and decompression rates, for holding times of 1 or 5 minutes, is most likely related to the former situation, since the results of the preliminary assays indicated that 400 MPa induced a complete, or near complete, inactivation of *L. innocua*.

The holding time had a very significant effect on the inactivation efficiency, particularly in the treatments with 300 MPa. The IF with 5 minute holding time was 8 times greater than with 1 minute, for slow compression and decompression, and only 3-4 times greater for intermediate and fast compression and decompression. However, the increase in pressure seems to have a strongest effect on the inactivation efficiency than the increase in holding time.

The results of the present work demonstrate that, in addition to the dependence on pressure and holding time generally exhibited by bacterial vegetative forms, the

321 efficiency of the high-pressure inactivation of *Listeria innocua* is also affected by
322 temperature and compression and decompression kinetics. *L. innocua* susceptibility was
323 significantly enhanced below room temperature which may provide some advantages
324 over pressure treatments at high temperature by better preserving food nutritional
325 properties, texture and flavor that may be perishable under high temperature processing.

326 Depending on the applied pressure and holding time, the compression and
327 decompression rates may be a relevant parameter in determining the inactivation
328 efficiency. The application of a low compression rate followed by high-pressure at 300
329 MPa during 5 minutes, and a low decompression rate, lead to enhanced *L. innocua*
330 inactivation, in relation to medium or high compression and decompression rates. At
331 400 MPa, complete inactivation of the cell suspensions is likely to occur and, in these
332 conditions, the compression and decompression rates do not have a significant effect on
333 the final inactivation factor.

334 Considering the interaction between temperature, extracellular medium and
335 pressurization kinetics in the *Listeria* inactivation, all these factors must be carefully
336 taken into consideration when HPP protocols are designed for particular food matrices.

Acknowledgments

Thanks are due to the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT, Portugal), European Union, QREN, FEDER, COMPETE for funding the research units QOPNA (PEst-C/QUI/UI0062/2013) and CESAM (PEst-C/MAR/LA0017/2011).

The authors are grateful to Prof. Paula Teixeira from *Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, Porto* for providing the *Listeria innocua* strain used in this study.

Conflicts of Interest

The authors disclose any conflicts of interest.

References

- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F. and Ray, B. (1998) Interaction of pressure, time and temperature of pressurization on viability loss of *Listeria innocua*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **14**: 251-253.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F. and Ray, B. (2000) Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* **60**: 33-42.
- Arroyo, G., Sanz, P.D. and Préstamo, G. (1999) Response to high-pressure, low-temperature treatment in vegetables: determination of survival rates of microbial populations using flow cytometry and detection of peroxidase activity using confocal microscopy. *Journal of Applied Microbiology* **86**: 544-556.
- Bajard, S., Rosso L., Fardel, G. and Flandrois, J. (1996) The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions. *International Journal of Food Microbiology* **29**: 201-211.
- Buzrul, S., Alpas, H., Largeteau, A. and Demazeau, G. (2008) Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in kiwifruit and pineapple juices by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* **124**: 275-278.
- Carlez, A., Rosec, J.P., Richard, N. and Cheftel, J.C. (1993) High-Pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **26**: 357-363.

- 374 Chapleau, N., Ritz, M., Delépine, S., Jugiau, F., Federighi, M. and de Lamballerie, M.
375 (2006) Influence of kinetic parameters of high pressure processing on bacterial
376 inactivation in a buffer system. *International Journal of Food Microbiology* **106**:
377 324-330.
- 378 Chen, H. (2007) Temperature-assisted pressure inactivation of *Listeria monocytogenes*
379 in Turkey breast meat. *International Journal of Food Microbiology* **117**: 55-60.
- 380 Dogan, C. and Erkmen, O. (2004) High pressure inactivation kinetics of *Listeria*
381 *monocytogenes* inactivation in broth, milk, and peach and orange juices. *Journal*
382 *of Food Engineering* **62**: 47-52.
- 383 Evrendilek, G.A. and Balasubramaniam, V.M. (2011) Inactivation of *Listeria*
384 *monocytogenes* and *Listeria innocua* in yogurt drink applying combination of high
385 pressure processing and mint essential oils. *Food Control* **22**: 1435-1441.
- 386 Gallo, L.I., Pilosof, A.M.R. and Jagus, R.J. (2007) Effective control of *Listeria innocua*
387 by combination of nisin, pH and low temperature in liquid cheese whey. *Food*
388 *Control* **18**: 1086-1092.
- 389 Gervilla, R., Ferragut, V. and Guamis, B. (2000) High pressure inactivation of
390 microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. *Journal of*
391 *Dairy Science* **83**: 674-682.
- 392 Gleeson, E. and O'Beirne, D. (2005) Effects of process severity on survival and growth
393 of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. *Food*
394 *Control* **16**: 677-685.
- 395 Gudbjornsdottir, B., Jonsson, A., Hafsteinsson, H. and Heinz, V. (2010) Effect of high-
396 pressure processing on *Listeria spp.* and on the textural and microstructural
397 properties of cold smoked salmon. *LWT - Food Science and Technology* **43**: 366-
398 374.

- 399 Hayakawa, I., Furukawa, S., Midzunaga, A., *et al.* (1998) Mechanism of inactivation of
400 heat-tolerant spores of *Bacillus stearothermophilus* IFO 12550 by rapid
401 decompression. *Journal of Food Science* **63**: 371-374.
- 402 Hugas, M., Garriga, M. and Monfort, J.M. (2002) New mild technologies in meat
403 processing: high pressure as a model technology. *Meat Science* **62**: 359-371.
- 404 Mackey, B.M., Forestière, K. and Isaacs, N. (1995) Factors affecting the resistance of
405 *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology* **9**: 1-11.
- 406 Margosch, D., Gänzle, M.G., Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F. (2004) Pressure
407 inactivation of *Bacillus* endospores. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:
408 7321-7328.
- 409 Miller, F.A., Gil, M.M., Brandão, T.R.S., Teixeira, P. and Silva, C.L.M. (2009)
410 Sigmoidal thermal inactivation kinetics of *Listeria innocua* in broth: Influence of
411 strain and growth phase. *Food Control* **20**: 1151-1157.
- 412 Noma, S., Shimoda, M. and Hayakawa, I. (2002) Inactivation of vegetative bacteria by
413 rapid decompression treatment. *Journal of Food Science* **67**: 3408-3411.
- 414 Patterson, M.F. (2005) Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied*
415 *Microbiology* **98**: 1400-1409.
- 416 Rademacher, B., Werner, F. and Pehl, M. (2002) Effect of the pressurizing ramp on the
417 inactivation of *Listeria innocua* considering thermofluidodynamical processes.
418 *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **3**: 19-24.
- 419 Ramirez, R., Saraiva, J., Lamela, C. P. and Torres, J. A. (2009). Reaction kinetics
420 analysis of chemical changes in pressure-assisted thermal processing. *Food*
421 *Engineering Reviews* **1**: 16-30.

- 422 Raso, J. and Barbosa-Cánovas, G.V. (2003) Nonthermal preservation of foods using
423 combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*
424 **43**: 265-285.
- 425 Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S., Balasubramaniam, V.M., Niranjan, K. and Knorr,
426 D. (2007) Opportunities and challenges in high pressure processing of foods.
427 *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **47**: 69-112.
- 428 Rendueles, E., Omer, M.K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R. and Prieto, M.
429 (2011) Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure
430 processing: A review. *LWT - Food Science and Technology* **44**: 1251-1260.
- 431 Smelt, J.P.P.M. (1998) Recent advances in the microbiology of high pressure
432 processing. *Trends in Food Science & Technology* **9**: 152-158.
- 433 Sousa, S. G., Delgadillo, I. and Saraiva, J. A. (2013) Human milk composition and
434 preservation: evaluation of high-pressure processing as a non-thermal
435 pasteurisation technology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, in
436 press.
- 437 Syed, Q.A., Buffa, M., Guamis, B. and Saldo, J. (2013) Lethality and injuring the effect
438 of compression and decompression rates of high hydrostatic pressure on
439 *Escherichia coli* O157: H7 in different matrices. *High Pressure Research* **33**: 64-
440 72.
- 441 Yang, B., Shi, Y., Xia, X., Xi, M., Wang, X., Ji, B. and Meng, J. (2012) Inactivation of
442 foodborne pathogens in raw milk using high hydrostatic pressure. *Food Control*
443 **28**: 273-278.
- 444 Yuste, J., Mor-Mur, M., Capellas, M. and Pla, R. (1999) *Listeria innocua* and aerobic
445 mesophiles during chill storage of inoculated mechanically recovered poultry
446 meat treated with high hydrostatic pressure. *Meat Science* **53**: 251-257.

- 447 Yuste, J., Capellas, M., Fung, D.Y.C. and Mor-Mur, M. (2004) Inactivation and
448 sublethal injury of foodborne pathogens by high pressure processing: Evaluation with
449 conventional media and thin agar layer method. *Food Research International* **37**: 861-
450 866.

FOR PEER

451 Table 1 – Compression and decompression rates calculated for the independent HPP
 452 experiments conducted with *Listeria innocua*

Kinetic parameters (MPa s ⁻¹)		
Pressure values (MPa)	Compression rate	Decompression rate
300	1.5	3.2
	6.4	12.9
	10.7	21.0
400	1.6	3.8
	6.9	14.8
	11.9	23.8

453

454

Figure captions

Figure 1- Inactivation factors (IF) calculated for the preliminary tests of *Listeria innocua* inactivation. Columns represent the average IF calculated from 3 independent treatments and the error bars represent the standard deviation. * indicates statistically significant differences ($P<0.05$).

Figure 2- Inactivation of *Listeria innocua* by HPP at different temperatures, with a pressurization at 300 MPa during 5 minutes. The results correspond to the average of 3 independent assays and the error bars represent the standard deviation. * indicates statistically significant differences ($P<0.05$).

Figure 3- Inactivation factors obtained in assays of *Listeria innocua* inactivation at 300 MPa with different compression and decompression rates. Columns represent the average results obtained in 3 independent assays and error bars represent the standard deviation.* indicates statistically significant differences ($P<0.05$).

Figure 4- Inactivation factors obtained in assays of *Listeria innocua* inactivation at 400 MPa with different compression and decompression rates. Columns represent the average results obtained in 3 independent assays and error bars represent the standard deviation.

Fig. 1

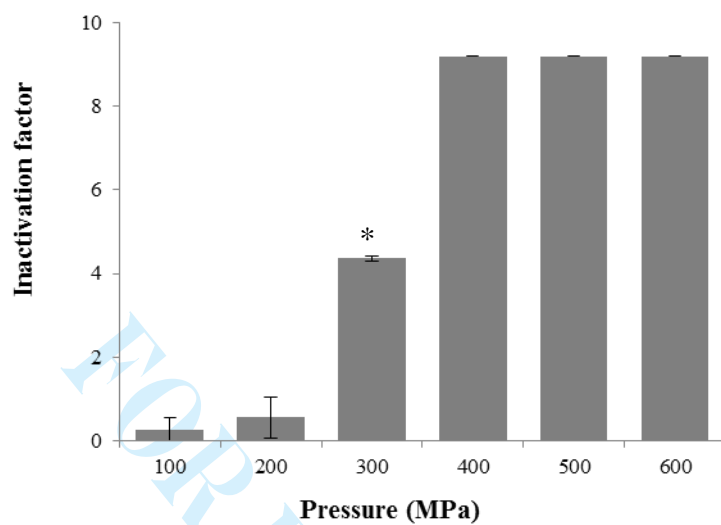


Fig. 2

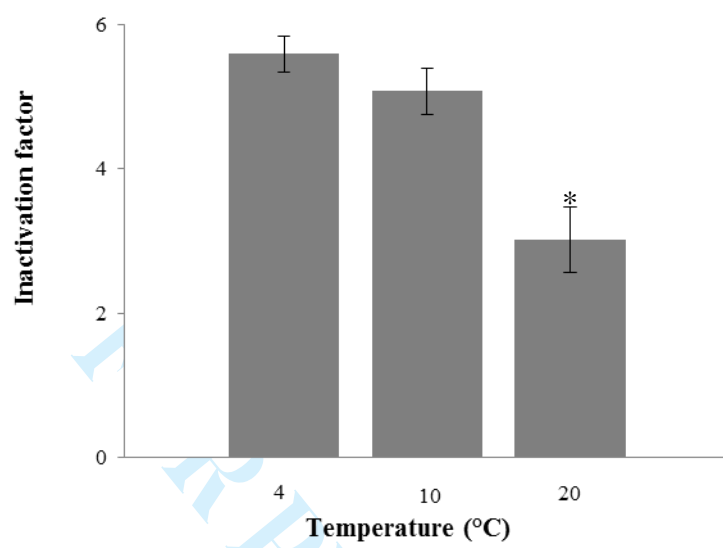


Fig. 3

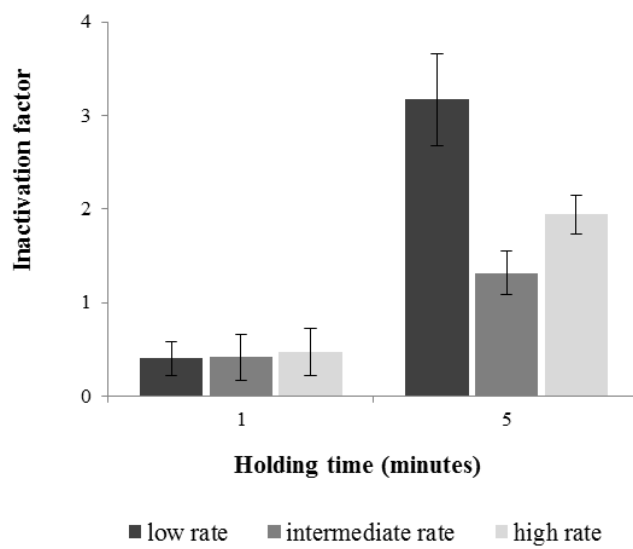
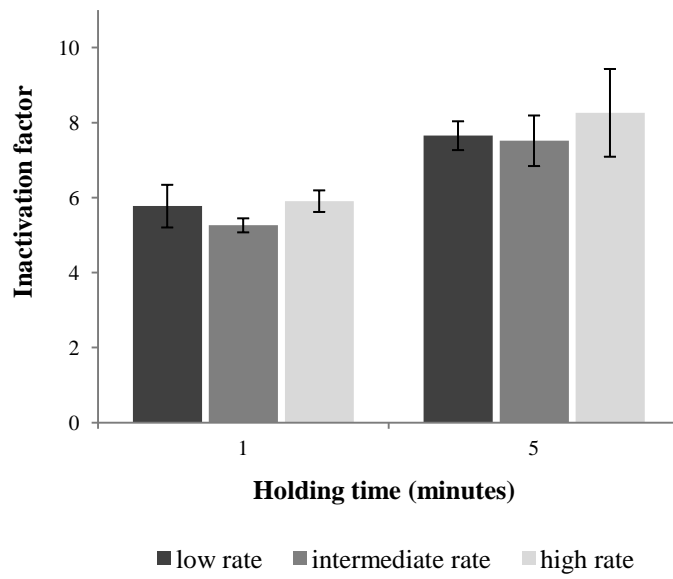
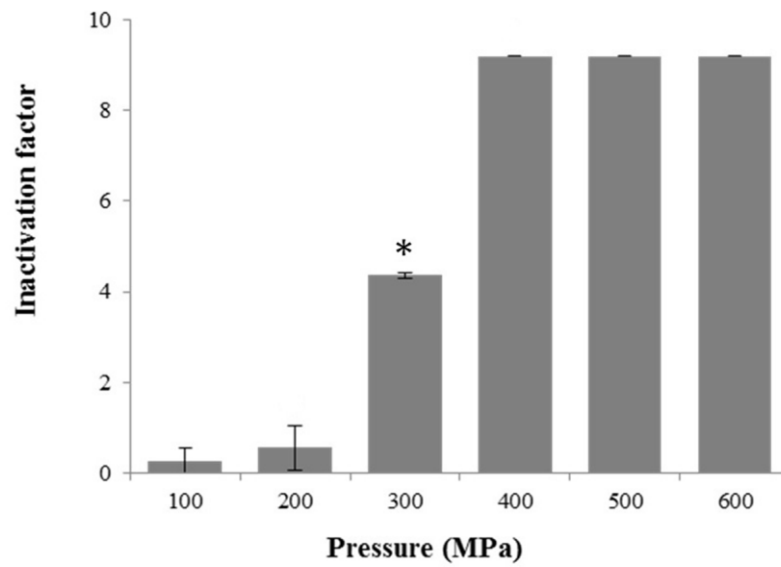


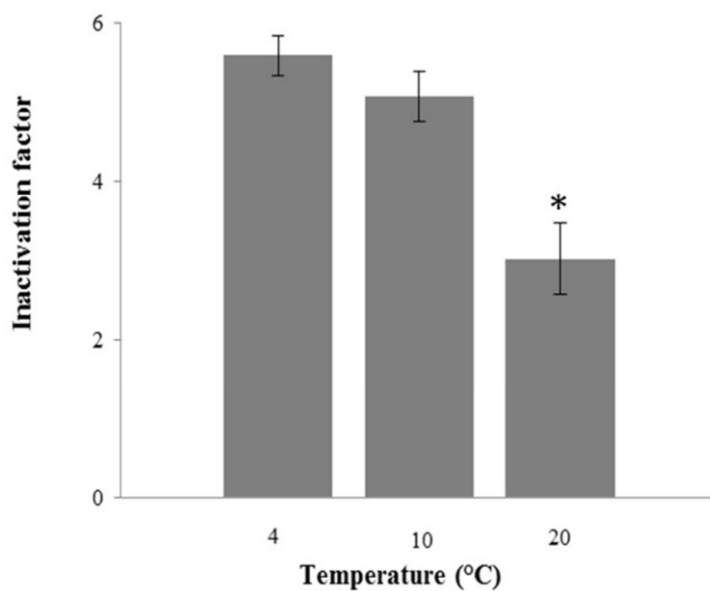
Fig. 4





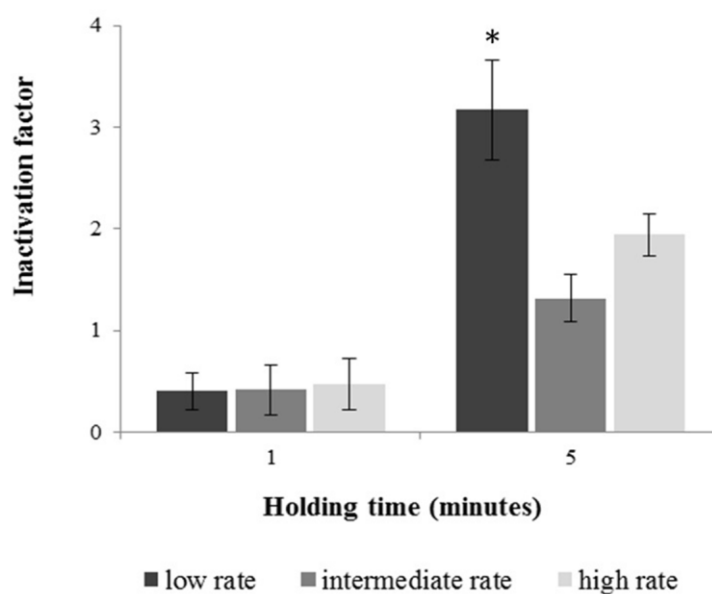
Inactivation factors (IF) calculated for the preliminary tests of *Listeria innocua* inactivation. Columns represent the average IF calculated from 3 independent treatments and the error bars represent the standard deviation. * indicates statistically significant differences ($P < 0.05$)

269x203mm (96 x 96 DPI)

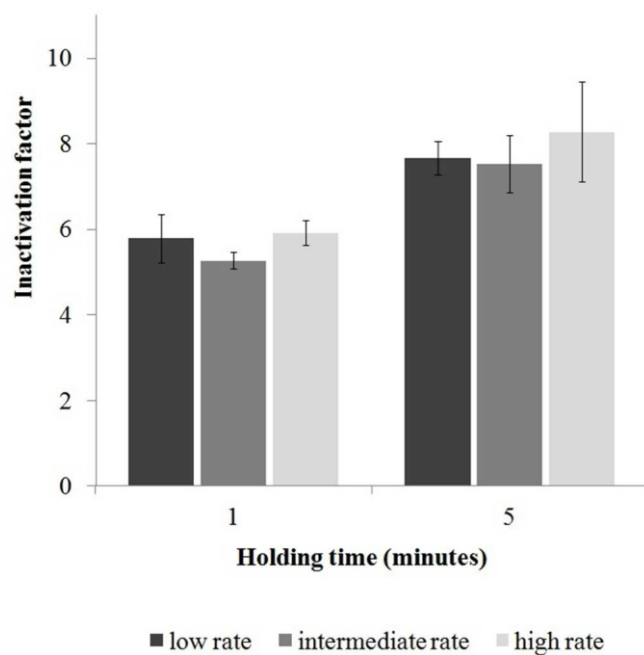


Inactivation of *Listeria innocua* by HPP at different temperatures, with a pressurization at 300 MPa during 5 minutes. The results correspond to the average of 3 independent assays and the error bars represent the standard deviation. * indicates statistically significant differences ($P < 0.05$).

267x203mm (96 x 96 DPI)



Inactivation factors obtained in assays of *Listeria innocua* inactivation at 300 MPa with different compression and decompression rates. Columns represent the average results obtained in 3 independent assays and error bars represent the standard deviation.* indicates statistically significant differences ($P < 0.05$). 268x203mm (96 x 96 DPI)



Inactivation factors obtained in assays of *Listeria innocua* inactivation at 400 MPa with different compression and decompression rates. Columns represent the average results obtained in 3 independent assays and error bars represent the standard deviation.
267x203mm (96 x 96 DPI)



Dissertação de mestrado: uma estratégia de divulgação

A difusão de conceitos, inerentes à presente dissertação de mestrado, entre um público não especializado foi instigada durante a unidade curricular de Seminários em Microbiologia II. Com o intuito de decodificar informações que são facilmente perceptíveis numa comunicação entre pares, mas apresentam dificuldades ao entendimento de pessoas não familiarizadas com a área, elaborou-se uma estratégia para chegar ao grande público: a criação de um conjunto de postais. Posteriormente, com vista conferir uma utilidade prática a este projeto decidiu-se pela entrega destes postais no ato da apresentação pública da dissertação ao público que se reunir e também como convite para a mesma, justificando-se assim a sua inclusão, como anexo, no documento da dissertação.

O postal como forma de comunicação

A criação de postais iniciou-se em meados do século XIX, uma época em que se verifica a emergência e desenvolvimento dos transportes e comunicações. Contemporâneos, na sua génese, com o aparecimento do telefone, fotografia e banda desenhada, apresentam-se como pioneiros no aliar de imagem à comunicação interpessoal (Correia, 2010; Milne, 2010). Prático, económico, bem como de fácil acesso e produção, este suporte foi protagonista de uma generalizada propagação que atingiu o seu apogeu durante as duas primeiras décadas do século seguinte (Martins *et al.*, 2011).

Antítese comunicacional, o postal cria a convergência entre a dicotomia público/privado. O primeiro domínio concretiza-se na face do postal através de linguagem essencialmente iconográfica, que possibilita a circulação aberta de vários tipos de informação. Por sua vez, o verso do postal é essencialmente dedicado ao domínio privado, estabelecendo uma ligação particular entre remetente e destinatário (Correia e Martins, 2011). Enquanto forma de difusão massiva de imagens, o postal foi, ao longo do tempo, apropriado por diversas entidades que lhe conferiram um carácter instrumental, sendo usado como suporte difusor na promoção de: símbolos religiosos,

obras de arte, temas eróticos e de humor, eventos, ideologias políticas, desde propaganda patriótica e nacionalista a caricaturas, sátiras a regimes e mensagens comerciais, tendo-se



Fig. 1. Página inicial do site <http://www.postalfree.net>.

afirmado como uma poderosa e barata ferramenta publicitária (Martins *et al.*, 2008; Correia, 2009). Esta última vertente apresenta, ainda nos dias de hoje, uma grande representação, mostrando assim uma forte resiliência por parte deste meio de comunicação numa era de grande expressão tecnológica (Correia e Martins, 2011). Mais do que isso, verifica-se a combinação de estratégias comunicativas como é o caso dos postais publicitários gratuitos, que para além de estarem associados a plataformas de divulgação digitais, podem ser fisicamente adquiridos de forma voluntária pelo recetor e apresentam mensagens comerciais, institucionais e de divulgação cultural e de eventos, como é o caso da *Postalfree* (Figura 1). O estabelecimento de contacto entre utilizadores, por via digital, é também facilitado para promover trocas de postais focando assim outra face notável do postal, que é tida em conta nesta abordagem: o cariz de objeto de coleção que lhe é inerente.

Ideal para guardar, mostrar, trocar o postal tem suscitado publicações e exposições, o que o torna excelente para dispersar informação tanto no espaço como no tempo (Correia, 2009; Correia e Martins, 2011). Neste âmbito, outra plataforma que impulsiona a troca de postais por todo o mundo dá pelo nome de *Postcrossing* (Figura 2) e constitui uma comunidade virtual internacional, através da qual os utilizadores



Fig. 2. Página inicial do site <http://www.postcrossing.com>.

trocam endereços enviando seguidamente postais entre si, os quais são registados no site no momento de receção. Assim, e dado o carácter interventivo e dinâmico

do postal na sociedade, selecionou-se este formato para concretizar a divulgação e elucidação de conceitos científicos, tal como seguidamente se pode verificar.

Postais desenvolvidos

Os postais criados destinam-se à transmissão, ao público em geral, de um procedimento que visa a criação e desenvolvimento de novo conhecimento ao nível científico e escolar: uma dissertação de mestrado. Assim, o fundo preto preenchido com letras brancas destina-se a aludir também ao contexto escolar. Embora a época tecnológica, que hoje em dia se vive, esteja em grande expansão, ainda há bem pouco tempo o contexto didático era bem diferente. Uma das primeiras impressões que surge quando se pensa numa escola remonta mesmo às memórias mais pueris, sendo traduzida pela imagem dos antigos quadros negros de ardósia, local primordial para a transmissão de conhecimento numa altura em que a comunicação se fazia branco no preto em vez de preto no branco.

A série desenvolvida conta com seis postais com 10 cm de altura e 15 de largura. Estes podem ser entendidos como uma sequencia informativa ou isoladamente, uma vez que embora diretamente relacionados, cada postal, por si só, consegue transmitir uma mensagem independente. Esta mensagem é composta por elementos figurados que se podem encontrar na frente do postal e reforçada por um pequeno texto explicativo no verso. Este contém ainda informação sobre as fontes das imagens, a autoria dos postais e as instituições onde foram desenvolvidos (Figura 3).

Seguidamente são apresentadas as frentes dos postais e o pequeno texto que lhes está associado no verso:



Fig. 3. Verso de um dos postais



Fig. 4. Frente do postal 1

Neste postal aparece uma composição com várias palavras que pretendem despertar curiosidade sobre o seu significado. O texto encontrado no verso pretende explicar de forma curta que estas palavras denominam as principais espécies bacterianas patogénicas, cujo veículo de transmissão é o alimento.



Fig. 5. Frente do postal 2.

O aparecimento de uma figura misteriosa e da expressão “Sob pressão” pretende, à semelhança do postal anterior, induzir a viragem do postal e leitura do texto informativo que visa explicitar a definição do conceito pressão e começar a levantar o véu sob a técnica de processamento por altas pressões.



Fig. 6. Frente do postal 3

Através deste postal pretende-se familiarizar o público com os níveis de pressão

Palavras. Fascinantes, enigmáticas, solenes no seu latim arcaico, despertaram um frémito de inquietação quando há segundos lhe invadiram o olhar. Encerram em si vida incógnita, bacteriana. Oculta perante o olhar humano, mas infinitamente poderosa. Responsável pela corrupção dos alimentos e origem de várias enfermidades.

A palavra pressão designa o exercer de uma força sobre uma superfície. Entre as várias unidades de quantificação que se utilizam é de destacar o Pascal (Pa), uma homenagem ao filósofo e matemático francês Blaise Pascal (1623-1662) cuja contribuição foi essencial no esclarecimento deste conceito.

A aplicação de Altas Pressões é uma técnica em expansão, em especial na esterilização alimentar.

Na Natureza os níveis de pressão oscilam entre 0,03 Mpa (Everest) e 110 Mpa na Fossa das Marianas a 10000 m de profundidade no oceano Pacífico.

Em contexto alimentar a técnica de pressurização faz uso de grandezas substancialmente mais elevadas: entre os 100 e os 1000 Mpa. A brutalidade desta força pode ser decifrada imaginando que 500 Mpa correspondem ao peso de três elefantes sobre um morango!

utilizados. Para tal, pretendeu-se, através de uma sugestiva analogia, concretizar os abstratos valores que são apresentados.



Fig. 7. Frente do postal 4

O mote deste postal foi apresentar as vantagens únicas que a tecnologia de alta pressão oferece no contexto alimentar relativamente aos métodos tradicionais. Assim e com o intuito de mostrar uma quebra entre este novo métodos e os atualmente utilizados evocou-se uma mudança de paradigma assente em acontecimentos históricos onde as mudanças acarretaram grande importância, como o Maio de 68 presente na ilustração ou a divisa dos ideais da Revolução francesa: *Liberté, Egalité, Fraternité*.



Fig. 8. Frente do postal 5

Com este postal aspira-se a uma contextualização mais direcionada para o principal objectivo da dissertação: a inativação de *Listeria* através de alta pressão hidrostática, no panorama da indústria alimentar. Na imagem verifica-se um alimento, uma maçã, com a Universidade de Aveiro, local onde os estudos decorrem, em plano de fundo e o trocadilho imPRESSIONA-TE.

Uma verdadeira revolução na indústria alimentar começa a emergir através da aplicação de novas técnicas de processamento como a aplicação de alta pressão.

Novos ideais são proclamados como a **Liberdade** perante o tamanho, volume e geometria dos produtos; a **Igualdade** e uniformidade de tratamento conferida pela pressão e a superior **Qualidade** conferida em termos de características sensoriais e preservação de vitaminas.

Listeria: pressão para matar

Sinopse: Num mundo onde a exigência dos consumidores por alimentos seguros é cada vez mais elevada urge uma necessidade de um controlo alimentar mais rigoroso. Tal como em outros pontos do globo desenrolam-se, na Universidade de Aveiro, a criação de estratégias para poderosa batalha contra *Listeria* um conjunto de seres invisíveis prontos a causar doença que se deslocam através dos alimentos. Perante este panorama a grande esperança é uma arma multi-alvo que dá pelo nome de Alta Pressão.



Fig. 9. Frente do postal 6.

“Aparelhei o barco da ilusão” para percorrer as tortuosas e turvas águas da investigação científica. Entreguei o seu leme ao fascínio da procura incessante por verdades ocultas, nuances quase abstractas que encerraram um potencial revolucionário.

Aportou esta deriva nos efeitos da Alta Pressão como força purificadora relevante no fabrico de alimentos seguros e prevenção de doenças, bem como procura de elementos catalisadores deste efeito. No entanto, nesta viagem toma a aprendizagem um carácter mais amplo, afinal “em qualquer aventura o que importa é partir, não é chegar.”

Contém excertos do poema Viagem de Miguel Torga

Neste postal volta-se a incidir no tema específico da dissertação: por um lado, apresentam-se detalhes ainda não mencionados, por outro é também revelada uma perspetiva pessoal da pulsão motivacional que norteou o processo de construção desde a sua génese. Este é o postal mais intimista de toda a série. Realça-se ainda o facto de que embora a obtenção dos objetivos inicialmente traçados seja fulcral, nenhuma das etapas deve ser menosprezada.

A face ilustrada mostra a autora do trabalho, bem como o símbolo e divisa da Universidade de Aveiro: *Theoria, Poiesis, Praxis*. O facto de estes três termos serem apresentados dando uma ideia de profundidade explicita a intenção de comunicar uma progressão durante o tempo de permanência nesta instituição: a apreensão da teoria durante os anos iniciais de aulas, o surgir de uma força motriz criadora através da interligação entre conhecimento adquirido e predisposição motivacional e por fim o planeamento e execução das ideias conferindo-lhes forma concreta- a prática.

Referências

- Correia M. L. 2008. O postal ilustrado da frente ao verso: imagens mais que reprodutíveis. *Logos-Tecnologias e Socialidades*. **29**:117-128.
- Correia M. L. 2009. Postais ilustrados, souvenirs íntimos e publicitários. *Anexo dos Congressos 6º SOPCOM/8º LUSOCOM*. Lisboa. 500-513.
- Correia M. L. 2010. Cartes postales: images mineures, dialogues brefs. *Latitudes – Cahiers Lusophones*. **37**:43-48.
- Correia M. L. e Martins M. 2011. O postal e a modernidade: memória, imagem e técnica. In Imagem e pensamento. Martins M., Miranda J. B., Oliveira M. e Godinho J. (Ed.). *Grácio Editor*. Coimbra. 320 pp. ISBN: 9789898377128.

Martins M., Pires H. e Oliveira M. 2008. Dos postais ilustrados aos posts nos weblogues para uma sócio-semiótica da imagem e do imaginário. In Comunicação e cidadania-Actas do 5º congresso da Associação Portuguesa de Ciências da Comunicação. Martins M. L. e Pinto M. (Ed.) *Centro de Estudos de Comunicação e Sociedade. Universidade do Minho*. Braga. ISBN: 978-989-95500-1-8.

Martins M. L., Oliveira M. e Correia M. L. 2011. Les images numériques s'imaginent l'archaïque : mettre en perspective les cartes postales. *Sociétés*.**111**: 163-177.

Milne E. 2010. Letters, Postcards, Email: technologies of presence. *Routledge*. Nova Iorque. 264 pp . ISBN: 0-203-86215-5.